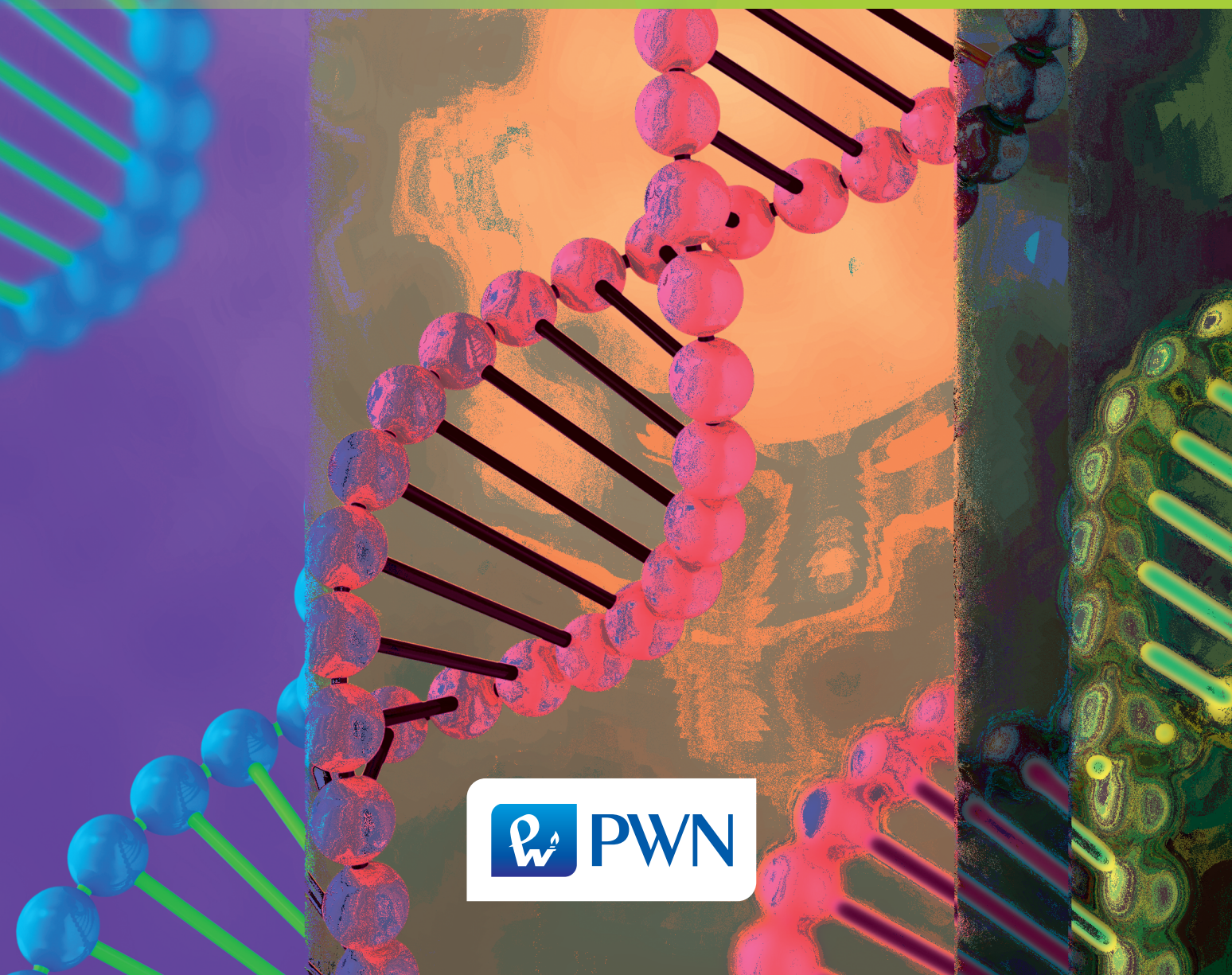
GENETYKA MEDYCZNA i MOLEKULARNA

Redakcja naukowa **Jerzy Bal**



PWN

GENETYKA MEDYCZNA i MOLEKULARNA

GENETYKA MEDYCZNA i MOLEKULARNA

Redakcja naukowa **Jerzy Bal**

PWN

Projekt okładki i stron tytułowych **Lidia Michalak**

Ilustracja na okładce **Fotolia/Vladimir Melnikov**

Wydawca **Katarzyna Włodarczyk-Gil**

Redaktor merytoryczny **Agata Nocuń**

Redaktor prowadzący **Adam Kowalski**

Produkcja **Mariola Grzywacka**

Dział reklamy **Agnieszka Borzęcka** (agnieszka.borzecka@pwn.com.pl)

Skład: **Auto Graf, Warszawa**

Książka jest zmienionym i poprawionym wydaniem trzech kolejnych edycji publikacji pt. *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*, pracy zbiorowej pod redakcją Jerzego Bala.

Książka, którą nabyłeś, jest dziełem twórcy i wydawcy. Prosimy, abyś przestrzegał praw, jakie im przysługują. Jej zawartość możesz udostępnić nieodpłatnie osobom bliskim lub osobiście znanym. Ale nie publikuj jej w internecie. Jeśli cytujesz jej fragmenty, nie zmieniaj ich treści i koniecznie zaznacz, czyje to dzieło. A kopiując jej część, rób to jedynie na użytek osobisty.

Szanujmy cudzą własność i prawo
Więcej na www.legalnakultura.pl
Polska Izba Książki

Copyright © by Wydawnictwo Naukowe PWN SA
Warszawa 2017

Wydanie pierwsze, dodruk 2
Warszawa 2018

ISBN: 978-83-01-19263-1

Wydawnictwo Naukowe PWN SA
02-460 Warszawa, ul. Gottlieba Daimlera 2
tel. 22 69 54 321, faks 22 69 54 288
infolinia 801 33 33 88
e-mail: pwn@pwn.com.pl;
reklama@pwn.pl, www.pwn.pl

Druk i oprawa: Elpil, Siedlce

Przedmowa do wydania czwartego

Przedstawiamy książkę *Genetyka molekularna i medyczna*. Jest ona w prostej linii kontynuacją trzech kolejnych, poczynając od 2001 r., wydań podręcznika *Biologia molekularna w medycynie*. *Elementy genetyki klinicznej*. Tak jak poprzednio, cel, jaki przed sobą stawiamy, to prezentacja współczesnej wiedzy z zakresu genetyki człowieka oraz osiągnięć i zastosowań metod biologii molekularnej w różnych działach medycyny. Jesteśmy też przekonani, że pełnemu zrozumieniu zmian, jakie dokonują się w medycynie, powinna towarzyszyć informacja z zakresu podstaw genetyki i praw rządzących przekazywaniem i ekspresją cech. Odzwierciedla to układ i zawartość książki.

Lata upływające od poprzedniego wydania naznaczone są przez kolejne kroki milowe w genetyce człowieka. Odkrycia antropologów w połączeniu z nowymi metodami analizy DNA dostarczają nowych danych o ewolucji człowieka, w tym o bagażu, jaki gromadził się w genomie na drodze zasiedlania przez naszych przodków kolejnych kontynentów. C. Venter i C. Hutchison zredukowali życie swobodnie żyjącego organizmu do 473 genów. Technologia CRISPR/Cas9 wydaje się być aplikacją na miarę przełomu, jaki w genetyce molekularnej dokonał się w latach 70/80 ubiegłego wieku za sprawą enzymów restrykcyjnych. Precyzyjne redagowanie genomu urealnia bowiem nadzieje, jakie wiąże się z terapią genową. Zadziwiająco szybko adaptowana do diagnostyki genetycznej metoda sekwencjonowania następnej generacji w wielu przypadkach osiągnęła status badania rutynowego. Jest kwestią krótkiego czasu, aby metoda ta stała się badaniem z wyboru również w przesiewie noworodkowym czy w farmakogenetyce. Nowe technologie analizy kwasów nukleinowych unaoczniają jednocześnie wyzwania, jakie stoją przed genetyką. Liczba danych otrzymywanych po analizie fragmentu DNA sekwencjonowanego metodą Sangera wzrosła eksponencjalnie spośród tysięcy lub milionów bajtów poprzez dziesiątek milionów dla mikromacierzy do dziesiątek miliardów w sekwencjonowaniu następnej generacji.

Zmiany w obecnym wydaniu obejmują nie tylko uaktualnienia przekazanych wcześniej informacji. Nowym rozdziałem jest *Epigenetyka*. Problematyka ta była obecna i w poprzednich wydaniach, ale jej znaczenie dla zrozumienia mechanizmów modyfikacji informacji genetycznej niewątpliwie uzasadnia nowe rozłożenie akcentów. Szerzej nakreślono również spektrum możliwości, jakie przynosi nieinwazyjna molekularna diagnostyka prenatalna. Więcej miejsca niż do tej pory poświęcamy takim zagadnieniom, jak bioinformatyka. W warsztacie genetyka sprawność w wykorzystywaniu dostępnych w internecie danych czy komputerowa analiza sekwencji nukleotydów w DNA już nie wystarcza. Znaczenia nabiera umiejętność stawiania stosownych pytań, jak i zdolność interpretacji wyników analizy eksomu czy genomu pacjenta. Nowym, niewątpliwe brakującym do tej pory, jest rozdział poświęcony epidemiologii chorób dziedzicznych.

Społeczne oddziaływania i odbiór genetyki są bliskie środowisku genetyków człowieka. To bar-

dzo pragmatyczne podejście. Efekty naszych działań będą bowiem tym większe, im większa będzie dla nich akceptacja i zrozumienie. W tym kontekście warto pytać o zasady i reguły towarzyszące genetyce medycznej. Taką też funkcję ma spełniać konsekwentnie uwspółcześniany rozdział poświęcony aspektom prawnym współczesnej genetyki.

Last but not least w rozdziale *Słabość i siła genocentrycznej wizji biologii* znajdzie czytelnik rozważania, czy, a jeżeli tak, to w jakim stopniu, koncepcja genu wpisuje się w rozwój nauki.

* * *

Nową pozycją wydawniczą wartą polecenia jest *Genetyka medyczna* E.S. Tobias, M Connor, M. Ferguson-Smith. Redakcja naukowa A. Latos-Bieleńska. PZWL Warszawa 2014. Szereg informacji z zakresu genetyki klinicznej znajdzie czytelnik również w podręczniku **G***enetyka medyczna.* Redakcja G. Drewa, T. Ferenc. Elsevier Urban & Partner. Wrocław 2011.

Jerzy Bal

Autorzy

Prof. dr hab. Jerzy Bal
Kieruje Zakładem Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka (ZGM IMiD) w Warszawie. Zajmuje się badaniami i diagnostyką molekularną chorób dziedzicznych.

Prof. dr hab. Ewa Bartnik
Pracuje w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (UW) oraz w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (IBB PAN). W ramach zainteresowań genetyką człowieka specjalizuje się w chorobach powodowanych defektem mitochondrialnego DNA.

Prof. dr hab. Ewa Bocian
Wieloletni pracownik ZGM IMiD, którym kierowała w latach 2011-2013. Specjalizuje się w badaniach i diagnostyce cytogenetycznej i molekularnej chorób dziedzicznych.

Dr hab. Leszek Bosek
Profesor na Wydziale Prawa i Administracji Uniwersytetu Warszawskiego, Prezes Prokuratorii Generalnej Skarbu Państwa.

Prof. dr hab. Ewa Brojer
Kierownik Zakładu Immunologii Hematologicznej Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (ZIHiT IHT) w Warszawie. Zajmuje się zagadnieniami alloimmunizacji antygenami komórek krwi w wyniku ciąży lub przetoczeń krwi, w tym badaniami molekularnymi antygenów komórek krwi. Interesuje się też diagnostyką molekularną wirusów przenoszonych przez krew.

Dr Barbara Czartoryska
Wieloletni pracownik w Zakładzie Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Specjalistka w zakresie badań biochemicznych i diagnostyki chorób lizosomalnych.

Dr Patrycja Daca-Roszak
Pracuje w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Specjalizuje się w zagadnieniach genetyki populacyjnej pod kątem kryminalistyki i ewolucji człowieka.

Prof. dr hab. nauk farm. Władysława A. Daniel
Kierownik Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Specjalizuje się w farmakokinetyce i metabolizmie leków działających na ośrodkowy układ nerwowy.

Dr Janusz Fiett
Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Narodowego Instytutu Leków (NIL) w Warszawie. Zajmuje się epidemiologią molekularną zakażeń bakteryjnych oraz metodami typowania bakterii opartymi na analizie DNA.

Alain Fischer
Profesor na Uniwersytecie im. Kartezjusza (Paryż V). Zajmuje się diagnostyką i leczeniem pierwotnych niedoborów odporności.

Dr Tomasz Gambin
Pracuje w Instytucie Informatyki na Politechnice Warszawskiej oraz w ZGM IMiD. Zajmuje się rozwijaniem narzędzi bioinformatycznych wykorzystywanych w badaniach i diagnostyce molekularnej.

Prof. dr hab. Marek Gniadkowski
Kierownik Zakładu Mikrobiologii Molekularnej NIL. Specjalizuje się w epidemiologii molekularnej zakażeń bakteryjnych.

Dr Monika Gos
Pracuje w ZGM IMiD. Zajmuje się badaniami i diagnostyką molekularną chorób dziedzicznych. Specjalizuje się w genetyce rozwoju.

Dr hab. Piotr Grabarczyk
Kierownik Zakładu Wirusologii IHT. Zajmuje się molekularną i serologiczną diagnostyką wirusologiczną.

Dr Katarzyna Guz
Pracuje w ZIHiT IHT. Specjalizuje się w badaniach molekularnych antygenów erytrocytów, płytek krwi i granulocytów oraz w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej konfliktów matczynopłodowych.

Prof. dr hab. Tomasz Grzybowski
Kieruje Katedrą Medycyny Sądowej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (CM UMK). Specjalizuje się w badaniach genetyczno-sądowych, populacyjnych i filogeograficznych.

Dr Radosław Izdebski
Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej NIL w Warszawie. Kurator bazy danych *Klebsiella pneumoniae* MLST Instytutu Pasteura w Paryżu. Zajmuje się epidemiologią molekularną zakażeń bakteryjnych ze szczególnym uwzględnieniem metod typowania bakterii opartych na sekwencjonowaniu DNA.

Prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski
Kieruje Zakładem Biologii Systemów na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego i Zakładem Biosyntezy Białka w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Zajmuje się genetyką rozwoju i adaptacji organizmów do środowiska oraz ewolucją molekularną.

Dr Józef Kapusta
Pracuje w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie. Przedmiotem pracy badawczej jest ekspresja w roślinach preparatów biomedycznych.

Dr hab. Piotr Kozioł
Wieloletni pracownik w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Specjalizuje się w zastosowaniu analizy DNA w badaniach pokrewieństwa.

Prof. dr hab. med. Anna Latos-Bieleńska
Kierownik Katedry i Zakładu Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zajmuje się epidemiologią i etiologią wad wrodzonych i rzadkich chorób genetycznych.

Prof. dr hab. med. czł. rzecz. PAN Janusz Limon
Kierownik Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zajmuje się genetyką i cytogenetyką nowotworów.

Dr Barbara Lisowska-Grospierre
Wieloletni dyrektor badań naukowych francuskiego Instytutu Badań Medycznych. W Laboratorium INSERM U429 w Szpitalu Neckera w Paryżu zajmowała się genetyką molekularną pierwotnych niedoborów odporności.

Prof. dr hab. med. Tadeusz Mazurczak
Wieloletni kierownik Zakładu Genetyki Medycznej IMiD. Specjalizuje się w genetyce klinicznej i poradnictwie genetycznym chorób dziedzicznych.

Dr hab. Jacek Nowak
Kierownik Zakładu Immunogenetyki IHT. Specjalizuje się w badaniach antygenów zgodności tkankowej, HLA i KIR oraz w immunogenetycznym doborze par biorca-dawca przeszczepu szpiku i badaniu związków genów z predyspozycją i przebiegiem chorób.

Dr Beata Nowakowska
Pracuje w ZGM IMiD. Kieruje Zespołem Pracowni Cytogenetycznych. Specjalizuje się w cytogenetyce klasycznej i molekularnej.

Dr Agnieszka Orzińska
Pracuje w ZIHiT IHT. Specjalizuje się w badaniach molekularnych antygenów erytrocytów, płytek krwi i granulocytów oraz w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej konfliktów matczynopłodowych.

Dr Norman Jan Pieniążek
Wieloletni pracownik i kierownik Laboratorium Referencyjnej Diagnostyki Molekularnej Narodowego Centrum Chorób Infekcyjnych, Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom w Atlancie. Specjalizuje się w diagnostyce molekularnej chorób pasożytniczych.

Prof. dr hab. med. Jacek Józef Pietrzyk
Wieloletni Kierownik Zakładu Genetyki Medycznej, Katedry Pediatrii, Instytutu Pediatrii, UJ, Collegium Medicum. Specjalizuje się w poradnictwie genetycznym chorób dziedzicznych i badaniach chorób kompleksowych.

Dr Tomasz Pniewski
Pracuje w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Przedmiotem zainteresowań i pracy badawczej jest ekspresja w roślinach preparatów biomedycznych.

Dr n. med. Magdalena Ratajska
Jest adiunktem w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Jej główne zainteresowania naukowe dotyczą genetyki nowotworów, głównie raka piersi i jajnika.

Dr n. med. Urszula Rogalla
Pracuje w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Sądowej Katedry Medycyny Sądowej CM UMK. Zajmuje się genetycznymi badaniami pokrewieństwa i pochodzenia biogeograficznego.

Dr Sylwia Rzońca
Pracuje w ZGM IMiD. Zajmuje się badaniami i diagnostyką molekularną chorób dziedzicznych. Specjalizuje się w genetyce molekularnej niepełnosprawności intelektualnej.

Prof. dr hab. Marek Safjan
W pracy naukowej w Instytucie Prawa Cywilnego UW zajmuje się prawem cywilnym i medycznym. Prezes Trybunału Konstytucyjnego w latach 1998–2006. Obecnie sędzia Europejskiego Trybunału Sprawiedliwości.

Prof. dr hab. Małgorzata Schlegel-Zawadzka
Swoje zainteresowania związane z aspektami żywieniowymi osób zdrowych i chorych realizuje w Wydziale Nauk o Zdrowiu Collegium Medicum UJ. Interesuje się aspektami kulturowymi odżywiania i jego wpływu na nasz stan zdrowia.

Prof. dr hab. Janusz A. Siedlecki
Kierownik Zakładu Onkologii Molekularnej i Transalacyjnej Centrum Onkologii Instytutu w Warszawie. Specjalizuje się w diagnostyce molekularnej chorób nowotworowych.

Dr Paweł Siedlecki
Adiunkt w Zakładzie Bioinformatyki IBB PAN i Instytutu Biologii Eksperymentalnej Roślin UW. Jest autorem publikacji z zakresu projektowania leków *in silico.* Uczy bioinformatyki na UW i Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Dr hab Katarzyna Tońska
Pracuje w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Wydziału Biologii UW. Zajmuje się diagnostyką molekularną i epidemiologią chorób mitochondrialnych oraz polimorfizmami mitochondrialnego DNA.

Prof. dr hab. med. Anna Tylki-Szymańska
Pracuje w Klinice Pediatrii Żywienia i Chorób Metabolicznych Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka". Zajmuje się diagnostyką i leczeniem osób z chorobami metabolicznymi.

Lek. Joanna Wiszniewska
Specjalistka z zakresie patologii i diagnostyki molekularnej chorób genetycznych w Baylor College of Medicine w Houston, USA.

Dr hab. Wojciech Wiszniewski
Pracuje w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Medycznej, Oregon Health & Sciences University w Portland, USA. Zainteresowania badawcze obejmują różne aspekty patologii molekularnej chorób dziedzicznych.

Prof. dr hab. Ewa Ziętkiewicz
Pracuje w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Specjalizuje się w zagadnieniach genetyki populacyjnej, epidemiologii genetycznej chorób rzadkich i molekularnych mechanizmach ewolucji *Homo sapiens.*

Spis treści

I. Zakres zastosowań diagnostyki molekularnej w medycynie *Jerzy Bal, Tadeusz Mazurczak* 1

II. Podstawy genetyki i genomiki *Jerzy Bal, Ewa Bocian* 5

II.1. Podstawy genetyki molekularnej 5
II.1.1. Kwas deoksyrybonukleinowy i jego replikacja 5
II.1.2. Odczytywanie informacji genetycznej 6
II.1.3. Regulacja ekspresji 11
II.1.3.1. Wyciszanie ekspresji genu 12
II.1.3.2. Piętnowanie genomowe 13
II.1.4. Gen 13
II.1.5. Świat RNA 14
II.2. Genom człowieka 15
II.2.1. Genomika 15
II.2.2. Struktura genomu 16
II.2.3. Kariotyp 18
II.2.3.1. Struktura chromosomu 19
II.2.3.2. Mitoza 21
II.2.3.3. Mejoza 22
II.3. Zmienność i dziedziczność 24
II.3.1. Mutacje 24
II.3.1.1. Mutacje dynamiczne 25
II.3.2. Aberracje chromosomowe 27
II.3.3. Polimorfizm 33
II.3.4. Relacje genotyp–fenotyp 35
II.3.4.1. Recesywność i dominacja 38
II.3.4.2. Antycypacja 38
II.3.5. Priony 39

III. Uwarunkowania genetyczne chorób dziedzicznych *Jerzy Bal, Tadeusz Mazurczak* 44

III.1. Dziedziczenie autosomalne recesywne 44
III.2. Dziedziczenie autosomalne dominujące 45
III.3. Dziedziczenie sprzężone z chromosomem X 46
III.4. Dziedziczenie wieloczynnikowe 46
III.5. Dziedziczenie mitochondrialne 49

IV. Genetyczna różnorodność współczesnych populacji ludzkich *Patrycja Daca-Roszak, Ewa Ziętkiewicz* 52

IV.1. Mechanizmy powstawania różnorodności genetycznej 52

IV.1.1. Mutacje i rodzaje markerów . . . 52
IV.1.2. Dryf genetyczny . . . 54
IV.1.3. Wpływ demografii na różnorodność populacji . . . 54
IV.2. Badanie historii populacji . . . 55
IV.2.1. Ocena poziomu różnorodności populacji i efektywna wielkość populacji . . . 55
IV.2.2. Ocena relacji miedzy populacjami . . . 56
IV.2.3. Metody koalescencyjne w badaniach ewolucji sekwencji i ocenie wieku mutacji . . . 56
IV.2.4. Analiza nierównowagi sprzężeń . . . 57
IV.3. Ewolucja *Homo s. sapiens* w świetle danych genetycznych . . . 58
IV.3.1. Modele teoretyczne . . . 58
IV.3.2. Różnorodność nukleotydowa i efektywna wielkość macierzystej populacji . . . 59
IV.3.3. Struktura genetyczna gatunku . . . 59
IV.3.4. Rozmieszczenie różnorodności w populacjach kontynentalnych . . . 59
IV.3.5. Wiek macierzystej populacji i datowanie ekspansji demograficznej *H. s. sapiens* . . . 60
IV.3.6. Model asymilacji . . . 61
IV.3.7. Procesy migracji i kolonizacja świata . . . 62
IV.3.8. Efekty założyciela w populacjach ludzkich . . . 63
IV.3.9. Problematyka interpretacji różnorodności genetycznej ewolucji człowieka . . . 64
IV.4. Analiza archaicznego DNA . . . 64
IV.4.1. Problemy metodyczne . . . 65
IV.4.2. Analiza archaicznych form *Homo sapiens* . . . 65
IV.4.3. Analiza procesów kolonizacji . . . 66
IV.4.4. Prehistoryczne migracje w Europie . . . 66
IV.5. Różnorodność genetyczna populacji w zastosowaniach praktycznych . . . 67
IV.5.1. Populacyjne różnice częstości alleli w praktyce medycznej . . . 67
IV.5.2. Genetyczny profil populacji a mapowanie asocjacyjne w chorobach złożonych . . . 68
IV.5.3. Określanie przynależności populacyjnej i pochodzenia osób – zastosowanie w medycynie sądowej . . . 68
IV.6. Kierunki dalszych badań . . . 70

V. Prawo a dylematy współczesnej genetyki *Marek Safian, Leszek Bosek* . . . 73
V.1. Standardy europejskie . . . 74
V.1.1. Kilka uwag prawnoporównawczych . . . 74
V.1.2. Unia Europejska . . . 79
V.1.3. Stanowisko Rady Europy . . . 82
V.1.4. Regulacje zawarte w Konwencji o Ochronie Praw Człowieka i Godności Istoty Ludzkiej wobec Zastosowań Biologii i Medycyny . . . 83
V.1.4.1. Zakaz dyskryminacji . . . 83
V.1.4.2. Prawo do wolności w sferze badań naukowych wobec genomu ludzkiego. Dopuszczalność dokonywania interwencji na ludzkim genomie (zmian w genomie) . . . 83
V.1.4.3. Ochrona prywatności i autonomii jednostki. Dopuszczalność przeprowadzania genetycznych testów prognozujących . . . 85
V.1.4.4. Zakaz dokonywania selekcji płci. Autonomia . . . 86
V.1.5. Postanowienia protokołu dodatkowego o zakazie klonowania . . . 86
V.1.6. Postanowienia protokołu dodatkowego o testach genetycznych . . . 87
V.2. Standardy powszechne . . . 90
V.3. Założenia do dalszej ewolucji regulacji prawnych . . . 91
V.4. Stan obecny według prawa polskiego . . . 92

VI. Metody analizy genomu . . . 101
VI.1. Metody badania kwasów nukleinowych *Jerzy Bal, Joanna Wiszniewska, Wojciech Wiszniewski* . . . 101
VI.1.1. Techniki analizy DNA . . . 101
VI.1.1.1. Enzymy restrykcyjne . . . 101
VI.1.1.2. Klonowanie DNA . . . 102
VI.1.1.3. Hybrydyzacja . . . 103
VI.1.1.4. Powielanie fragmentu DNA . . . 106
VI.1.1.5. Sekwencjonowanie DNA . . . 108
VI.1.1.6. Redagowanie DNA . . . 111
VI.1.2. Identyfikacja mutacji . . . 113
VI.1.3. Mapowanie i identyfikacja genów. . . . 117
VI.2. Metody analizy cytogenetycznej i cytogenetyki molekularnej *Ewa Bocian* . . . 119

VI.2.1. Oznaczanie kariotypu . . . 119
VI.2.1.1. Techniki hodowli komórkowych . . . 120
VI.2.2. Metody analizy chromosomów . . . 120
VI.2.2.1. Analiza prążkowa . . . 122
VI.2.2.2. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* FISH . . . 127
VI.2.2.3. Porównawcza hybrydyzacja genomowa . . . 131
VI.2.3. Identyfikacja chromatyny płciowej . . . 136
VI.3. Bioinformatyka . . . 137
VI.3.1. Bazy danych i narzędzia bioinformatyczne *Paweł Siedlecki* . . . 137
VI.3.1.1. Bazy danych . . . 137
VI.3.1.2. Struktura i wizualizacja makromolekuł . . . 144
VI.3.1.3. Interaktory białkowe . . . 147
VI.3.1.4. Bazy literatury naukowej . . . 148
VI.3.1.5. Przegląd wybranych narzędzi bioinformatycznych . . . 150
VI.3.2. Sekwencjonowanie następnej generacji *Tomasz Gambin* . . . 155
VI.3.2.1. Formaty danych . . . 157
VI.3.2.2. Potok przetwarzania danych z NGS . . . 159
VI.3.2.3. Kontrola jakości . . . 163
VI.3.2.4. Interpretacja i raportowanie wyników . . . 165

VII. Aspekty kliniczne aberracji chromosomowych *Ewa Bocian, Tadeusz Mazurczak* . . . 171
VII.1. Wskazania do analizy kariotypu . . . 173
VII.2. Zespoły niestabilności chromosomów. . . . 175
VII.3. Interpretacja kariotypu. . . . 176
VII.4. Kontrola jakości badań diagnostycznych w cytogenetyce klinicznej . . . 178

VIII. Diagnostka molekularna . . . 179
VIII.1. Strategia działania *Jerzy Bal, Wojciech Wiszniewski, Joanna Wiszniewska* . . . 179
VIII.1.1. Badanie sposobu dziedziczenia się genu . . . 180
VIII.1.2. Analiza mutacji . . . 183
VIII.1.3. Poblemy diagnostyczne . . . 191
VIII.2. Nieinwazyjna prenatalna diagnostyka molekularna *Katarzyna Guz, Beata Nowakowska, Agnieszka Orzińska, Sylwia Rzońca* . . . 193
VIII.2.1. Wolne cyrkulujące płodowe kwasy nukleinowe . . . 194
VIII.2.2. Markery dla wolnego płodowego DNA . . . 195
VIII.2.3. Metody separacji i identyfikacji . . . 196
VIII.2.4. Przykłady zastosowań NIPT . . . 197
VIII.2.4.1. Identyfikacja płci płodu . . . 197
VIII.2.4.2. Diagnostyka chorób autosomalnych . . . 198
VIII.2.4.3. Identyfikacja aneuploidii oraz zmian strukturalnych chromosomów . . . 199
VIII.2.4.4. Zastosowanie NIPT w badaniach konfliktów matczyno-płodowych . . . 201
VIII.2.4.5. Zastosowanie łożyskowospecyficznych miRNA w diagnostyce wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu płodu oraz stanu przedrzucawkowego . . . 203
VIII.3. Testy genetyczne *Jerzy Bal*. . . . 204

IX. Choroby genetycznie uwarunkowane . . . 207
IX.1. Immunogenetyka *Barbara Lisowska-Grospierre, Alain Fischer* . . . 208
X.1.1. Dziedziczne choroby układu odpornościowego . . . 209
IX.1.1.1. Ciężki złożony niedobór odporności . . . 209
IX.1.1.2. Funkcjonalne niedobory odporności limfocytów T . . . 211
IX.1.1.3. Wadliwe różnicowanie lub funkcja limfocytów B . . . 215
IX.1.1.4. Dziedziczne choroby autoimmunologiczne . . . 215
IX.1.1.5. Choroby złożone . . . 217
IX.1.2. Antygeny zgodności tkankowej *Ewa Brojer, Katarzyna Guz, Jacek Nowak* . . . 218
IX.1.2.1. Funkcje i mechanizmy działania HLA . . . 218
IX.1.2.2. Podłoże genetyczne antygenów HLA . . . 220
IX.1.2.3. Polimorfizm HLA . . . 222
IX.1.2.4. Zjawisko niezrównoważenia sprzężeń . . . 223
IX.1.2.5. Metody oznaczania antygenów HLA . . . 223
IX.1.2.6. Nazewnictwo antygenów HLA . . . 225
IX.1.2.7. Zastosowanie i znaczenie badań antygenów HLA . . . 225
IX.1.2.7.1. Transplantologia . . . 227
IX.1.2.7.2. Transfuzjologia . . . 230

IX.1.2.7.3. Rejestry . . . 230
IX.1.2.8. HLA a występowanie chorób . . . 231
IX.1.2.9. Antygeny krwinek czerwonych, płytek i granulocytów . . . 233
IX.2. Choroby kompleksowe *Jacek J. Pietrzyk* . . . 245
IX.2.1. Klasyfikacja . . . 245
IX.2.2. Znaczenie populacyjne . . . 245
IX.2.3. Genetyka populacyjna – metodyka . . . 246
IX.2.3.1. Diagnoza fenotypowa . . . 246
IX.2.3.2. Selekcja . . . 246
IX.2.3.3. Analiza segregacyjna . . . 247
IX.2.3.4. Analiza sprzężeniowa . . . 248
IX.2.3.5. Analiza asocjacji . . . 248
IX.2.4. Oszacowanie udziału czynników genetycznych i środowiskowych w etiologii chorób kompleksowych . . . 250
IX.2.4.1. Modele dziedziczenia . . . 251
IX.2.4.2. Odziedziczalność . . . 251
IX.2.5. Identyfikacja genów głównych . . . 252
IX.2.6. Wybrane przykłady chorób kompleksowych . . . 255
IX.2.6.1. Astma alergiczna jako model choroby kompleksowej . . . 255
IX.2.6.2. Choroba Hirschsprunga . . . 256
IX.2.6.3. Cukrzyca typu I . . . 256
IX.2.6.4. Wady cewy nerwowej . . . 258
IX.2.6.5. Wady wrodzone serca . . . 259
IX.2.7. Specyfika poradnictwa genetycznego w chorobach kompleksowych . . . 261
IX.2.8. Aktualny stan badań w chorobach kompleksowych . . . 262
IX.2.9. Przyszłe kierunki badań – oczekiwania i ograniczenia . . . 262
IX.3. Choroby nowotworowe – aspekty molekularne *Janusz A. Siedlecki* . . . 265
IX.3.1. Molekularne aspekty chorób nowotworowych . . . 265
IX.3.1.1. Etapy karcynogenezy . . . 267
IX.3.1.2. Zaburzenia w transmisji sygnałów wzrostu – onkogeny . . . 270
IX.3.1.3. Utrata zdolności do rozpoznawania sygnałów antywzrostowych – geny supresorowe . . . 274
IX.3.1.4. Zaburzenia w systemach naprawy DNA – geny stabilizacyjne . . . 274
IX.3.1.5. Cykl komórkowy a transformacja nowotworowa . . . 276
IX.3.1.5.1. Regulacja cyklu komórkowego . . . 276
IX.3.1.5.2. Fosforylacja białek a cykl komórkowy . . . 284
IX.3.1.5.3. Konsekwencje deregulacji cyklu komórkowego . . . 286
IX.3.1.6. Zmiany epigenetyczne a transformacja nowotworowa . . . 287
IX.3.1.7. Nabywanie nieograniczonego potencjału podziałowego a transformacja nowotworowa . . . 290
IX.3.1.8. Transformacja nowotworowa a apoptoza . . . 292
IX.3.1.9. Nabywanie zdolności do unaczynienia guza . . . 294
IX.3.1.10. Nabywanie zdolności do tworzenia nacieków i przerzutów . . . 296
IX.3.2. Diagnostyka molekularna . . . 301
IX.3.2.1. Markery biochemiczne . . . 301
IX.3.2.2. Markery genetyczne . . . 302
IX.3.3. Znaczenie badań genetycznych w klinice . . . 312
IX.4. Choroby nowotworowe – aspekty cytogenetyczne *Janusz Limon, Magdalena Ratajska* . . . 313
IX.4.1. Białaczki i chłoniaki . . . 313
IX.4.2. Lite guzy. Mięsaki . . . 317
IX.4.3. Inne nowotwory . . . 319
IX.4.4. Badanie predyspozycji genetycznych . . . 320
IX.4.5. Poradnictwo genetyczne w zespołach dziedzicznej predyspozycji do nowotworów . . . 321
IX.4.5.1. Dziedziczne raki piersi i jajnika . . . 322
IX.4.5.2. Dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego . . . 325
IX.4.6. Wskazania do badań molekularnych . . . 326
IX.5. Choroby mitochondrialne *Ewa Bartnik, Katarzyna Tońska* . . . 328
IX.5.1. Genom mitochondrialny . . . 328
IX.5.2. Mutacje mitochondrialnego DNA . . . 331
IX.5.3. Mutacje genomu jądrowego prowadzące do chorób mitochondrialnych . . . 331
IX.5.4. Korelacje genotyp-fenotyp w chorobach mitochondrialnych . . . 334
IX.5.5. Diagnostyka chorób mitochondrialnych . . . 334
IX.5.6. Poradnictwo genetyczne w chorobach mitochondrialnych . . . 337

IX.5.7. Leczenie chorób mitochondrialnych i strategie reprodukcyjne . . . 337
IX.5.8. Polimorfizm mtDNA . . . 338
IX.5.9. Mitochondria w chorobach nowotworowych . . . 339
IX.5.10. Mitochondria a starzenie . . . 339

X. Epigenetyka *Monika Gos* . . . 342
X.1. Regulacja epigenetyczna . . . 343
X.2. Mechanizmy regulacji epigenetycznej . . . 344
X.2.1. Metylacja DNA . . . 344
X.2.2. Modyfikacje kowalencyjne białek histonowych . . . 346
X.2.3. Struktura chromatyny . . . 346
X.2.4. Białka związane z regulacją ekspresji genów i przebudowaniem struktury chromatyny . . . 349
X.2.5. Niekodujący RNA . . . 349
X.3. Rodzicielskie piętnowanie genomowe . . . 350
X.4. Zaburzenia procesów regulacji epigenetycznej jako przyczyna chorób dziedzicznych . . . 352
X.4.1. Choroby związane z nałożeniem nieprawidłowego wzoru epigenetycznego . . . 352
X.4.2. Choroby związane z defektem w genach kodujących modyfikatory epigenetyczne . . . 364
X.5. Somatyczne zmiany epigenetyczne jako efekt konstytutywnego defektu genetycznego . . . 371
X.6. Epigenetyczne zmiany somatyczne jako przyczyna chorób kompleksowych . . . 371
X.6.1. Nowotwory . . . 373
X.6.2. Demencja/otępienie . . . 375
X.6.3. Choroby układu krążenia . . . 376
X.7. Dziedziczenie międzypokoleniowe . . . 376

XI. Genetycznie uwarunkowana zmienność osobnicza a współczesne problemy zdrowotne . . . 379
XI.1. Farmakogenetyka *Władysława A. Daniel* . . . 379
XI.1.1. Farmakogenetyka jako nowa dziedzina nauki . . . 379
XI.1.2. Polimorfizm reakcji utleniania z udziałem cytochromu P450 . . . 381
XI.1.3. Polimorfizm reakcji sprzęgania . . . 386
XI.1.3.1. N-acetylotransferaza . . . 386
XI.1.3.2. S-transferaza glutationowa . . . 387
XI.1.3.3. UDP-glukuronylotransferaza . . . 387
XI.1.3.4. S-metylotransferaza tiopuryny . . . 388
X.1.4. Fenotypowanie . . . 388
X.1.4.1. Fenotypowanie w kierunku aktywności cytochromu P450 . . . 389
XI.1.4.2. Fenotypowanie w kierunku aktywności N-acetylotransferazy 2 . . . 390
XI.1.5. Kliniczne znaczenie farmakogenetyki . . . 390
XI.1.6. Czy farmakogenetyka dotyczy jedynie enzymów metabolizujących leki? . . . 393
XI.1.6.1. Polimorfizm transporterów leków . . . 393
XI.1.6.2. Polimorfizm receptorów i transporterów neuroprzekaźników . . . 393
XI.1.7. Farmakogenetyka i farmakogenomika a indywidualizacja farmakoterapii . . . 395
XI.2. Nutrigenetyka *Małgorzata Schlegel-Zawadzka* . . . 396
XI.2.1. Produkty żywnościowe, składniki pokarmowe, zwyczaje i nawyki żywieniowe . . . 397
XI.2.2. Metodyka badań . . . 397
XI.2.3. Interakcja składników diety i genów . . . 400
XI.2.4. Fenotyp żywieniowy . . . 400
XI.2.5. Indywidualizacja diety, zapobieganie chorobom dietozależnym . . . 403
XI.2.6. Etyczne problemy a żywieniowe badania genetyczne . . . 404

XII. Leczenie – praktyka i nadzieje . . . 407
XII.1. Znaczenie terapii *Jerzy Bal, Tadeusz Mazurczak* . . . 407
XII.2. Genetyczne choroby metaboliczne – możliwości leczenia *Anna Tylki-Szymańska, Barbara Czartoryska* 409
XII.2.1. Definicja choroby metabolicznej . . . 409
XII.2.2. Przyczyny zaburzeń przemian metabolicznych . . . 410
XII.2.3. Diagnostyka . . . 411
XII.2.4. Możliwości lecznicze . . . 411
XII.2.4.1. Działanie na poziomie metabolitu . . . 412
XII.2.4.2. Działanie na poziomie zmutowanego enzymu . . . 413
XII.2.4.3. Inne formy terapii . . . 418
XII.2.5. Skuteczność leczenia – „choroby rzadkie” . . . 418
XII.3. Terapia genowa chorób dziedzicznych *Jerzy Bal* . . . 419
XII.3.1. Modele zwierzęce chorób dziedzicznych . . . 420

XII.3.2. Przywrócenie utraconej funkcji – transfer genu . . . 420
XII.3.3. Zablokowanie ekspresji . . . 422
XII.3.4. Redagowanie DNA . . . 423
XII.4. Terapia genowa chorób nowotworowych *Janusz A. Siedlecki* . . . 423
XII.4.1. Supresja fenotypu nowotworowego . . . 424
XII.4.2. Odpowiedź gospodarz–nowotwór . . . 425
XII.4.3. Niszczenie komórek nowotworowych . . . 425
XII.4.4. Ochrona komórek macierzystych . . . 425
XII.4.5. Antyangiogenna forma terapii nowotworów . . . 426
XII.5. Terapia – wzmocnienie genetyczne – predyspozycje *Jerzy Bal* . . . 427

XIII. Poradnictwo genetyczne i profilaktyka chorób *Tadeusz Mazurczak* . . . 429

XIII.1. Poradnictwo genetyczne . . . 429
XII.l.1. Definicja i cele poradnictwa genetycznego . . . 430
XII.1.2. Metodyka poradnictwa genetycznego . . . 431
XII.1.3. Aspekty psychologiczne poradnictwa genetycznego . . . 434
XIII.2. Profilaktyka chorób genetycznych . . . 438

XIV. Epidemiologia chorób genetycznie uwarunkowanych *Anna Latos-Bieleńska* . . . 443

XIV.1. Częstość występowania chorób genetycznych w różnych okresach życia człowieka . . . 443
XIV.2. Choroby genetyczne a choroby rzadkie. Rejestry chorób genetycznych . . . 444
XIV.3. Epidemiologia poszczególnych rodzajów chorób genetycznych. . . . 445
XIV.3.1. Aberracje chromosomowe i choroby genomowe . . . 445
XIV.3.2. Choroby uwarunkowane jednogenowo . . . 446
XIV.3.3. Choroby uwarunkowane wielogenowo/wieloczynnikowo (choroby kompleksowe) . . . 450
XIV.4. Epidemiologia wrodzonych wad rozwojowych . . . 451

XV. Spektrum zastosowań biologii molekularnej . . . 457

XV.1. Analiza DNA w genetyce sądowej *Piotr Kozioł, Urszula Rogalla, Tomasz Grzybowski* . . . 457
XV.1.1. Badania genetyczne w ustalaniu ojcostwa . . . 457
XV.1.1.1. Aspekty prawne . . . 458
XV.1.1.2. Markery genetyczne w analizie ojcostwa . . . 459
XV.1.1.3. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego . . . 461
XV.1.1.4. Analiza wyników w ekspertyzie dla sądu . . . 463
XV.1.2. Badanie śladów biologicznych w sprawach kryminalnych . . . 468
XV.1.2.1. Polimorfizm chromosomu Y . . . 472
XV.1.2.2. Polimorfizm DNA mitochondrialnego . . . 475
XV.1.2.3. Sekwencjonowanie następnej generacji w genetyce sądowej . . . 478
XV.1.2.4. Badania predykcyjne . . . 479
XV.1.2.5. Analiza pochodzenia biogeograficznego w genetyce sądowej . . . 482
XV.1.3. Banki profili genetycznych . . . 485
XV.2. Diagnostyka chorób infekcyjnych i inwazyjnych . . . 486
XV.2.1. Podstawy diagnostyki molekularnej *Norman J. Pieniążek* . . . 486
XV.2.1.1. Przykłady zastosowania . . . 487
XV.2.1.2. Kontrola jakości . . . 488
XV.2.1.3. Nowe czynniki infekcyjne . . . 489
XV.2.1.4. Epidemiologia molekularna . . . 492
XV.2.1.5. Prawny status molekularnych testów diagnostycznych . . . 494
XV.2.2. Analiza genetyczna w bakteriologii i epidemiologii zakażeń bakteryjnych *Janusz Fiett, Radosław, Izdebski, Marek Gniadkowski* . . . 494
XV.2.2.1. Strategie i obszary zastosowań analizy genetycznej . . . 494
XV.2.2.2. Wykrywanie obecności bakterii w materiale klinicznym i środowisku . . . 495
XV.2.2.3. Identyfikacja taksonomiczna . . . 497
XV.2.2.4. Metody genetyczne w epidemiologii zakażeń bakteryjnych . . . 499
XV.2.2.5. Wykrywanie i charakterystyka elementów genetycznych związanych z rozprzestrzenianiem, zjadliwością i lekoopornością bakterii . . . 505
XV.2.2.6. Genomika bakterii i jej zastosowania . . . 508
XV.2.2.7. Dostępność, przetwarzanie i wymiana danych . . . 509
XV.2.3. Diagnostyka wirusów przenoszonych przez krew *Ewa Brojer, Piotr Grabarczyk* . . . 511
XV.2.3.1. Wirusy wykrywane we krwi ludzkiej i ich znaczenie w transfuzjologii . . . 511
XV.2.3.2. Molekularne badania przeglądowe u dawców krwi . . . 511
XV.2.3.3. Metody i diagnostyka wirusologiczna . . . 512
XV.3. Biotechnologia *Józef Kapusta, Tomasz Pniewski* . . . 519

XV.3.1. Szczepionki . . . 520
XV.3.1.1. Wykorzystanie bakteryjnego systemu ekspresji w produkcji szczepionek . . . 522
XV.3.1.2. Otrzymywanie szczepionek w roślinach . . . 524
XV.3.2. Indukcja tolerancji immunologicznej . . . 531
XV.3.3. Wytwarzanie przeciwciał monoklonalnych . . . 532
XV.3.3.1. Rośliny transgeniczne jako bioreaktor do wytwarzania przeciwciał monoklonalnych . . . 532
XV.3.3.2. Przeciwciała monoklonalne a ochrona roślin . . . 533
XV.3.4. Biotechnologia w pozyskiwaniu naturalnych farmaceutyków roślinnych . . . 533
XV.3.5. Produkcja w roślinach związków biologicznie aktywnych, terapeutyków i nutraceutyków . . . 536
XV.3.6. Zwierzęta transgeniczne w produkcji biofarmaceutyków . . . 537
XV.3.7. Komórki macierzyste, medycyna regeneracyjna, klonowanie i terapia transplantacyjna . . . 537
XV.3.8. Biotechnologia medyczna z perspektywy lat – nowe wyzwania . . . 545

XVI. Słabość i siła genocentrycznej wizji biologii *Andrzej Jerzmanowski* . . . 549

XVII. Uzupełnienia i załączniki *Jerzy Bal, Ewa Bocian* . . . 557
XVII.1. Kod genetyczny . . . 557
XVII.2. Przygotowanie materiału do badania . . . 557
XVII.2.1. Pobranie krwi na izolację DNA . . . 557
XVII.2.2. Pobranie krwi do badania cytogenetycznego . . . 558
XVII.3. Nazewnictwo genów i mutacji . . . 558
XVII.4. Ważniejsze osiągnięcia w genetyce i biologii molekularnej w latach 1953–2016 . . . 560
XVII.5. Słownik terminów . . . 562
XVII.6. Przykłady wyników diagnostyki molekularnej . . . 566
XVII.7. Deklaracja świadomej zgody . . . 573
XVII.8. Konwencja o Ochronie Praw Człowieka i Godności Istoty Ludzkiej wobec Zastosowań Biologii i Medycyny . . . 574
XVII.9. Projekt Protokołu Dodatkowego do Konwencji o Ochronie Praw Człowieka i Godności Istoty Ludzkiej wobec Zastosowań Biologii i Medycyny w sprawie zakazu klonowania istot ludzkich . . . 581
XVII.10. Projekt komentarza do projektu Protokołu Dodatkowego w sprawie zakazu klonowania istot ludzkich . . . 582
XVII.11. Protokół Dodatkowy do Konwencji o Prawach Człowieka i Biomedycynie o testach genetycznych dla celów zdrowotnych . . . 583

ROZDZIAŁ I

Zakres zastosowań diagnostyki molekularnej w medycynie

Jerzy Bal, Tadeusz Mazurczak

Poznanie informacji genetycznej człowieka (sekwencji nukleotydowej całego genomu) w sposób radykalny zmienia spojrzenie na medycynę. Przypominając *Anatomię człowieka* Andreasa Wesaliusza z 1543 roku, która odegrała ważną rolę w rozwoju medycyny, McKusick proponował dla badania struktury i zmian w genomie wprowadzenie określenia „anatomia genomu". Konsekwentnie, porównywanie genomów to „anatomia porównawcza i rozwojowa", badanie ekspresji genów to „anatomia czynnościowa i patologiczna". Nie przesądzając aktualności proponowanej terminologii, nie ulega wątpliwości, że współczesna medycyna postrzegana jest jako medycyna molekularna. Wcześniejsze i dokładniejsze rozpoznawanie chorób, postęp w leczeniu, nowe możliwości rokowania rozwoju choroby i profilaktyka to praktyka współczesnej medycyny.

Rozwój metod analizy genomu towarzyszący postępowi medycyny molekularnej powoduje, że coraz powszechniej znajdują one zastosowanie w diagnostyce rutynowej. W klasycznym badaniu cytogenetycznym oceniana jest morfologia chromosomów. Analiza kwasów nukleinowych umożliwia badanie sekwencji nukleotydów cząsteczki DNA czy RNA. Nowe technologie powoli zacierają te różnice, a tradycyjny podział traci na aktualności.

Klasyczne badania cytogenetyczne z powodzeniem są wykonywane w laboratoriach diagnostycznych od początku lat sześćdziesiątych XX wieku. Przełomowi lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych zeszłego stulecia towarzyszyło stopniowe wprowadzanie techniki analizy DNA. Formalne zakończenie, na początku XXI wieku, programu sekwencjonowania genomu człowieka zaowocowało pokonywaniem kolejnych barier metodycznych oraz istotnym przyspieszeniem badań nad wykorzystaniem metod biologii molekularnej w diagnostyce medycznej. Hybrydyzacja *in situ* czy też sekwencjonowanie DNA są już rutynowymi technikami diagnostycznymi. Również w Polsce, w wielu laboratoriach powstałych głównie przy zakładach genetyki medycznej, techniki te są wprowadzane do codziennej praktyki badawczej. Dzięki nowym technologiom badania i diagnostyka molekularna uległy kolejnym przeobrażeniom. Wprowadzenie mikromacierzy umożliwia nie tylko zwiększenie liczby analiz, ale także, jak w przypadku porównawczej hybrydyzacji genomowej, identyfikację delecji czy duplikacji o wielkości nawet kilku kpz, co w klasycznej cytogenetyce było nieosiągalne. W jednym eksperymencie można obecnie identyfikować markery w całym genomie czy analizować ekspresję równocześnie setek genów. Kolejne przyspieszenie przynoszą z sobą metody genomowego sekwencjonowania DNA (sekwencjonowanie następnej generacji). W tym jednak przypadku wydaje się, że uzyskana ilość informacji często jeszcze znacznie przewyższa możliwość ich wykorzystania i zrozumienia, zarówno w świetle obróbki informatycznej, jak i wiedzy, którą obecnie dysponujemy.

Zwiększający się zakres badań molekularnych w medycynie łączył się przede wszystkim z za-

Tabela I-1. Zakres zastosowań diagnostyki molekularnej w medycynie

Specjalności		Zastosowanie
Zasadniczo wszystkie specjalności medyczne ze szczególnym uwzględnieniem:	• genetyki klinicznej • onkologii • wirusologii • bakteriologii • parazytologii • farmakogenetyki • transplantologii • epidemiologii • medycyny sądowej	• diagnostyka • patologia molekularna • badania przesiewowe • badania prognostyczne • monitorowanie terapii • ustalanie pokrewieństwa • badanie śladów biologicznych

adaptowaniem do celów diagnostyki laboratoryjnej techniki PCR – enzymatycznego powielania fragmentów DNA. Dzięki tej technice uległa zwiększeniu czułość i specyficzność badań. Zaowocowało to licznymi zastosowaniami w analizie mikrośladów biologicznych, ale również i w badaniu np. wymarłych gatunków zwierząt czy roślin. Obecność DNA wykryto metodą PCR między innymi w liczących około 135 milionów lat okazach owadów zatopionych w bursztynie czy liczących 5–7 tysięcy lat zmumifikowanych zwłokach faraonów. Znaczącym wynikiem tego typu badań, który zapewne na stałe znajdzie miejsce w historii genetyki człowieka, było wykazanie przyczyny śmierci dziecka, którego szczątki liczące kilka tysięcy lat odkopano w Izraelu. Wykazano, że prawdopodobną przyczyną śmierci była β-talasemia. Wprowadzenie do diagnostyki medycznej techniki PCR uprościło również procedury badawcze, umożliwiając ich automatyzację i wytworzenie wielu rodzajów ogólnie dostępnych testów.

Ciągle poszerza się zakres zastosowań biologii molekularnej w medycynie (*tab. I-1*). Poszerza się również zakres możliwości genetyki medycznej. Na przykład w 1995 roku zidentyfikowano niespełna 60 genów, w tym geny, których defekty są odpowiedzialne za wystąpienie zespołu Aperta i zespołu Cruzona (receptor 2 czynnika wzrostu fibroblastów), zespołu Sanfillipo A, zespołu Blooma, zespołu Werdniga–Hoffmana, raka piersi czy choroby Alzheimera (presenilina 1 i presenilina 2). W 2003 roku poinformowano o zsekwencjonowaniu całego genomu jądrowego człowieka i poznaniu jego wszystkich 25 000 genów struktury. Nie jest to jednak równoznaczne z poznaniem podłoża molekularnego wszystkich chorób uwarunkowanych genetycznie. Zbadanie ekspresji poszczególnych genów i określenie związku między defektem w DNA a występowaniem zmian fenotypowych, czy też odwrotnie, wymaga wielu lat badań. Ponadto należy pamiętać, że ustalenie takich zależności jest stosunkowo łatwe w przypadku chorób dziedziczących się jako cecha monogenowa. Określenia współzależności dla chorób warunkowanych przez wiele genów należy oczekiwać od nowych technologii dopiero wkraczających do biologii.

Na szczególne podkreślenie zasługuje wzrastające znaczenie cytogenetyki i analizy molekularnej w onkologii. Zgromadzone wyniki umożliwiają w wielu przypadkach wczesne rozpoznanie obecności komórek nowotworowych, określenie przebiegu choroby, a w wielu – wybranie rodzaju terapii. Analiza molekularna genów zgodności tkankowej jest badaniem nieodłącznie związanym z transplantologią. Nowe metody badawcze umożliwiają też niezwykle precyzyjne prześledzenie pokrewieństwa wśród członków badanej rodziny w sytuacji czy to spornego ojcostwa, czy identyfikacji mikrośladów. Szczególną rolę i znaczenie metod biologii molekularnej należy dostrzegać w diagnostyce chorób infekcyjnych, inwazyjnych i pasożytniczych. W tym przypadku wyjątkowo duży postęp dokonał się w diagnostyce wolno rosnących lub trudnych do hodowli patogenów. Dzięki możliwości analizy bakteryjnego rybosomowego RNA (rRNA) czułość stosowanych technik zwiększyła się przeszło tysiąc razy. Dostępne handlowo zestawy diagnostyczne umożliwiają identyfikację określonych patogenów (np. *M. pneumoniae*) w materiale biologicznym, przy czym przeprowadzenie badania trwa około dwóch godzin.

Identyfikacja genów, których defekty są odpowiedzialne za choroby uwarunkowane genetycznie, oraz rozwój metod analizy kwasów nukleinowych stanowią również podstawę do wprowadzania no-

wych typów leczenia w medycynie. Wynikom pierwszych prób klinicznych terapii genowej niektórych chorób dziedzicznych i nowotworowych towarzyszy ostrożny optymizm. Należy pamiętać, że nadzieje zarówno badaczy, jak i chorych wobec tej nowej koncepcji leczenia były i są nadal ogromne. Jest to tym bardziej zrozumiałe, że dotychczas stosowane metody terapii charakteryzują się brakiem skuteczności lub małą skutecznością wobec większości chorób genetycznych. Niezależnie od mnogości problemów natury biologicznej i technologicznej, które trzeba jeszcze wyjaśnić i rozwiązać, wydaje się, że w ciągu najbliższych lat terapia genowa stanie się metodą z wyboru w leczeniu niektórych chorób dziedzicznych, nowotworowych oraz pewnych chorób infekcyjnych. Terapia genowa dopiero puka do drzwi medycyny. Nie oznacza to jednak, że jesteśmy całkowicie bezradni w leczeniu chorób dziedzicznych. W tzw. chorobach metabolicznych suplementacja enzymatyczna, mimo olbrzymich kosztów jednostkowych, prowadzona jest również w Polsce.

Wraz z poszerzaniem naszej wiedzy i rozwojem narzędzi analizy genomu uczestniczymy w zmianie priorytetów, jakimi kieruje się genetyka medyczna. Z jednej strony dotyczy to zwiększonego zainteresowania genetycznie uwarunkowanymi chorobami cywilizacyjnymi, a z drugiej indywidualizacją medycyny. Często w odniesieniu do badań genetycznych używa się określeń medycyna spersonalizowana czy precyzyjna. Diagnostyka genetyczna będzie obejmować identyfikację osób o zwiększonej predyspozycji do wystąpienia takich schorzeń, jak nadciśnienie, cukrzyca czy choroby psychiczne. Już obecnie wykrywane są mutacje czy markery w specyficznych genach, określające podatność zachorowania na wiele typów nowotworów, w tym raka sutka, raka gruczołu krokowego czy czerniaka. Badanie osobniczych predyspozycji genetycznych najlepiej ilustrują możliwości farmako- i nutrigenetyki.

Farmakogenetyka zajmuje się genetycznie uwarunkowaną zmiennością reakcji organizmu na leki. Zmienność ta, odzwierciedlając zróżnicowanie populacyjne, może mieć charakter nieoczekiwany, niepożądany, a czasami wręcz zagrażający życiu. Możliwość identyfikacji metodami molekularnymi genotypów warunkujących tego rodzaju reakcje jest już wykorzystywana w medycynie do optymalizacji farmakoterapii. Genetycznie uwarunkowana zmienność osobnicza stopnia tolerancji na składniki pokarmowe leży dla odmiany u podstaw nutrigenetyki. Coraz częściej w debacie publicznej przywracane jest określenie medycyna translacyjna. Nie chodzi tu jednak o jakikolwiek związek z procesem biosyntezy białek, jak mógłby to odczytać niejeden z biologów, a o przenoszenie i szybką integrację wyników badań podstawowych do praktycznych zastosowań klinicznych. Wydaje się, że wykorzystanie na potrzeby genetyki medycznej nowych technologii biologii molekularnej, a w szczególności metod analizy kwasów nukleinowych, stanowi idealną platformę dla tej nowej gałęzi nauki biomedycznej.

Praktycznym przejawem wykorzystania metod biologii molekularnej w rutynowej diagnostyce medycznej jest powszechny dostęp do ponad 3000 różnych testów genetycznych. Osiągnięcia biologii molekularnej i możliwości manipulacji genetycznych rodzą jednak problemy społeczne, etyczne i prawne, które towarzyszą poznawaniu i „wglądowi" w ludzki DNA. Wiele wątpliwości reguluje kodeks lekarski. Ponieważ jednak w molekularną diagnostykę kliniczną zaangażowani są również specjaliści z dziedzin pozamedycznych, tworzone nowe normy prawne powinny rozwiązywać możliwie wszystkie niejasności istniejące na tym polu. Dotyczy to warunków i kryteriów kwalifikacji osób do badań molekularnych (warunek świadomej zgody) oraz sposobu przechowywania informacji i dostępności do danych uzyskanych w wyniku analizy DNA. Wydaje się, że poza określonymi prawnie wyjątkami tylko osobom najbardziej zainteresowanym, a więc chorym lub zagrożonym wystąpieniem schorzenia, powinno przysługiwać prawo do uzyskania informacji na ten temat. Ujawnianie ich szerszemu gronu osób może bowiem naruszać prawa jednostki lub grupy osób.

Wprowadzenie metod analizy molekularnej do diagnostyki medycznej sprawia, że umiejętność „myślenia genetycznego" jest jednym z zasadniczych elementów edukacji współczesnego lekarza. Znajomość podstaw genetyki medycznej, w tym cytogenetyki i genetyki molekularnej, staje się niezbędna zarówno dla racjonalnego, odpowiadającego poziomowi współczesnej wiedzy i możliwościom, planowania badań diagnostycznych, właściwej interpretacji uzyskanych wyników, jak i indywidualizacji leczenia.

Piśmiennictwo uzupełniające

1. Strachan T., Read A.P.: *Human molecular genetics*. Wyd. 4. Garland Sciences, 2011.
2. *Zastosowania biologii w medycynie a godność osoby ludzkiej.* Aspekty etyczne i prawne. Red. T. Mazurczak. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
3. Ashley E.A.: *Towards precision medicine.* Nature Review Genetics 17, 507–522, 2016.

ROZDZIAŁ II

Podstawy genetyki i genomiki

Jerzy Bal, Ewa Bocian

II.1. Podstawy genetyki molekularnej 5

II.1.1. Kwas deoksyrybonukleinowy i jego replikacja (5) • II.1.2. Odczytywanie informacji genetycznej (6) • II.1.3. Regulacja ekspresji (11) • II.1.3.1. Wyciszanie ekspresji genu (12) • II.1.3.2. Piętnowanie genomowe (13) • II.1.4. Gen (13) • II.1.5. Świat RNA (14)

II.2. Genom człowieka 15

II.2.1. Genomika (15) • II.2.2. Struktura genomu (16) • II.2.3. Kariotyp (18) • II.2.3.1. Struktura chromosomu (19) • II.2.3.2. Mitoza (21) • II.2.3.3. Mejoza (22)

II.3. Zmienność i dziedziczność 24

II.3.1. Mutacje (24) • II.3.1.1. Mutacje dynamiczne (25) • II.3.2. Aberracje chromosomowe (27) • II.3.3. Polimorfizm (33) • II.3.4. Relacje genotyp–fenotyp (35) • II.3.4.1. Recesywność i dominacja (38) • II.3.4.2. Antycypacja (38) • II.3.5. Priony (39)

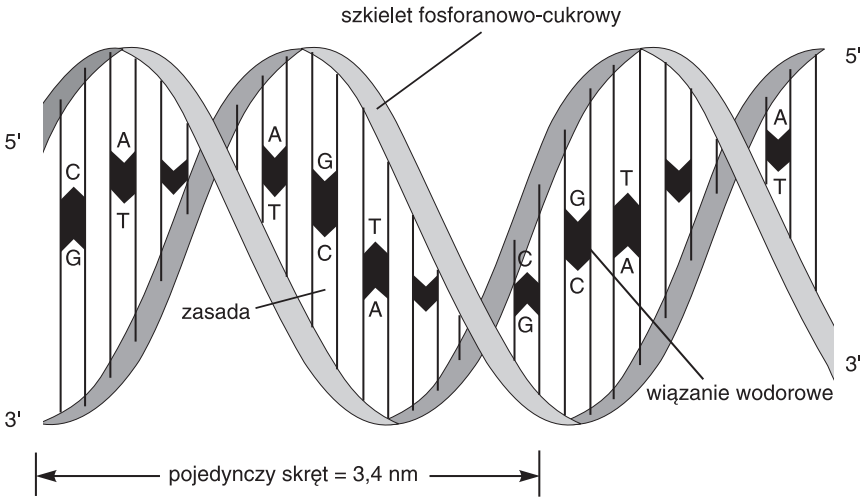
II.1. Podstawy genetyki molekularnej

II.1.1. Kwas deoksyrybonukleinowy i jego replikacja

Podstawową jednostką organizacji DNA jest nukleotyd. Zbudowany jest on z trzech elementów: cukru, zasady azotowej (adeniny, guaniny, cytozyny lub tyminy) oraz reszty kwasu fosforowego. Składnikiem cukrowym jest pięciowęglowa deoksyryboza. Cukier ten, łącząc się z zasadą, tworzy nukleozyd. W zależności od zasady wchodzącej w jego skład, nukleozyd z przyłączoną resztą fosforanową to jeden z czterech nukleotydów: A, G, C lub T. Nukleotydy, łącząc się ze sobą, tworzą łańcuchy. DNA jest więc wielkocząsteczkowym polimerem deoksyrybonukleotydów.

Model struktury kwasu deoksyrybonukleinowego został zaproponowany przez Watsona i Cricka w 1953 roku. Zgodnie z nim cząsteczka DNA składa się z dwóch przeciwbieżnych łańcuchów nukleotydowych skręconych spiralnie wokół siebie. Orientację łańcuchów ułatwia to, że reszta fosforanowa łącząca nukleozydy przyłącza się do węgla 3' jednego cukru i 5' sąsiedniego. Łańcuchy spirali zorientowane są więc: jeden od końca 5' do 3', a drugi od końca 3' do 5'. Konstrukcja tej helisy utrzymywana jest między innymi dzięki tworzeniu się między zasadami obu łańcuchów wiązań wodorowych. Szkielet stanowią składniki cukrowo-fosforanowe, a zasady usytuowane są w środku cząsteczki. Układ zasad w jednym łańcuchu determinuje ich układ w drugim w myśl reguły, że adenina łączy się zawsze z tyminą, a cytozyna – z guaniną. Łańcuchy w tak zbudowanej cząsteczce DNA określa się jako komplementarne (*ryc. II-1*). Różnice między cząsteczkami DNA pochodzącymi z odmiennych organizmów dotyczą topologii cząsteczki, sekwencji nukleotydów i długości łańcucha. W zależności od organizmu liczba nukleotydów w jednej cząsteczce DNA wynosi od 10^5 do 10^{11} (*ryc. II-2*). Wzajemne zależności nukleotydów w DNA określa się stosunkiem A + T/G + C. Jest to wielkość charakterystyczna i stała dla DNA każdego organizmu.

Replikacja DNA jest procesem, który poprzedza podział komórki. W jej wyniku powstają kopie macierzystego DNA rozdzielane następnie do komórek potomnych. Odwzorowaniu podlega osobno każda z nici DNA. Replikacja jest katalizowana przez skomplikowany kompleks enzymatyczny, zawierający enzymy rozplatające helisę DNA



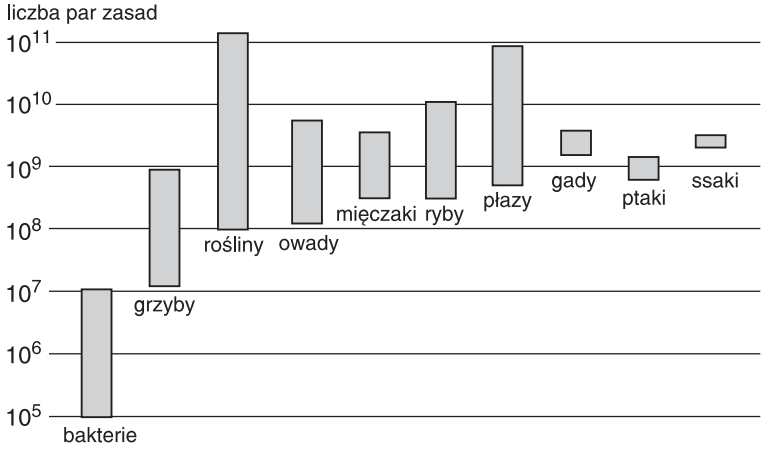
Rycina II-1. Budowa podwójnej helisy DNA

(helikazy DNA), białka stabilizujące jednoniciowy DNA oraz co najmniej trzy różne polimerazy DNA. Te ostatnie enzymy powodują polikondensację deoksyrybonukleotydów na matrycy, którą są obie nici rodzicielskiego DNA. W wyniku replikacji prowadzonej zgodnie z zasadą komplementarności powstają więc dwie identyczne cząsteczki dwuniciowego DNA, z których każda zawiera nić starą (rodzicielską) i nić nową. Taki typ replikacji jest określany jako semikonserwatywny (*ryc. II-3*).

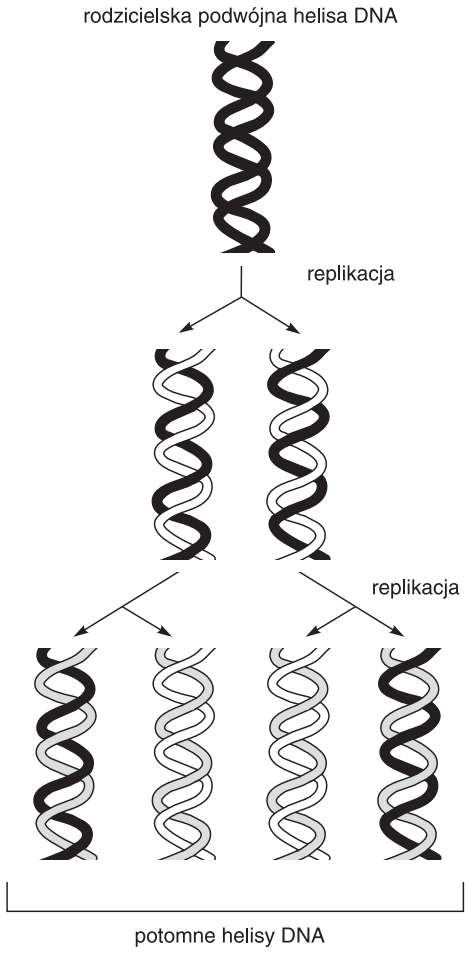
W organizmach eukariotycznych replikacja zachodzi z szybkością około 50 nukleotydów na sekundę. Jej swoistość jest przy tym bardzo duża. Jeden błąd zdarza się przeciętnie raz na 10^6 nowo wstawianych nukleotydów. Ewentualne błędy mogą być naprawiane już w czasie trwania replikacji przez same polimerazy DNA lub też przez specjalne wieloenzymatyczne systemy naprawcze. Większość pozostałych uszkodzeń jest naprawiana przed kolejną rundą replikacji DNA. Konsekwencją nienaprawionych błędów są mutacje prowadzące do zmiany w sekwencji DNA. Zmiany te są utrwalane w następnych rundach replikacyjnych.

II.1.2. Odczytywanie informacji genetycznej

W DNA, w jego sekwencji nukleotydów, jest zakodowana informacja o strukturze i rodzaju białek, różnych klasach RNA oraz o właściwościach regulacyjnych genów. Odczytywanie informacji dotyczącej białek odbywa się w dwóch etapach. W pierwszym, zwanym transkrypcją, po rozpleceniu helisy jednoniciowe fragmenty DNA są przepisywane na cząsteczki informacyjnego RNA (ang. messenger RNA, mRNA). W drugim etapie, translacji, sekwencje nukleotydowe mRNA zostają przetłumaczone na sekwencje aminokwasów. W procesie



Rycina II-2. Wielkość genomów różnych organizmów



Rycina II-3. Model semikonserwatywnej replikacji DNA. W każdej rundzie replikacyjnej, poprzedzającej podział komórki, obie nici są wykorzystywane jako matryce do syntezy komplementarnego łańcucha. Powstająca w ten sposób podwójna helisa składa się zawsze z łańcucha starego i nowego, a przekazywany zapis informacji genetycznej nie ulega zmianie

translacji jest niezbędny udział transferowych kwasów nukleinowych (tRNA) oraz rybosomów.

RNA, podobnie jak DNA, jest polimerem nukleotydów. Różnice w stosunku do DNA polegają na tym, że ryboza zastępuje deoksyrybozę, a uracyl (U) zastępuje tyminę (T). RNA występuje przeważnie w formie jednoniciowej. Przestrzennie jest to cząsteczka bardzo pofałdowana, choć w zasadzie nie tworzy długich struktur dwuniciowych, komplementarne fragmenty nici mogą się ze sobą łączyć.

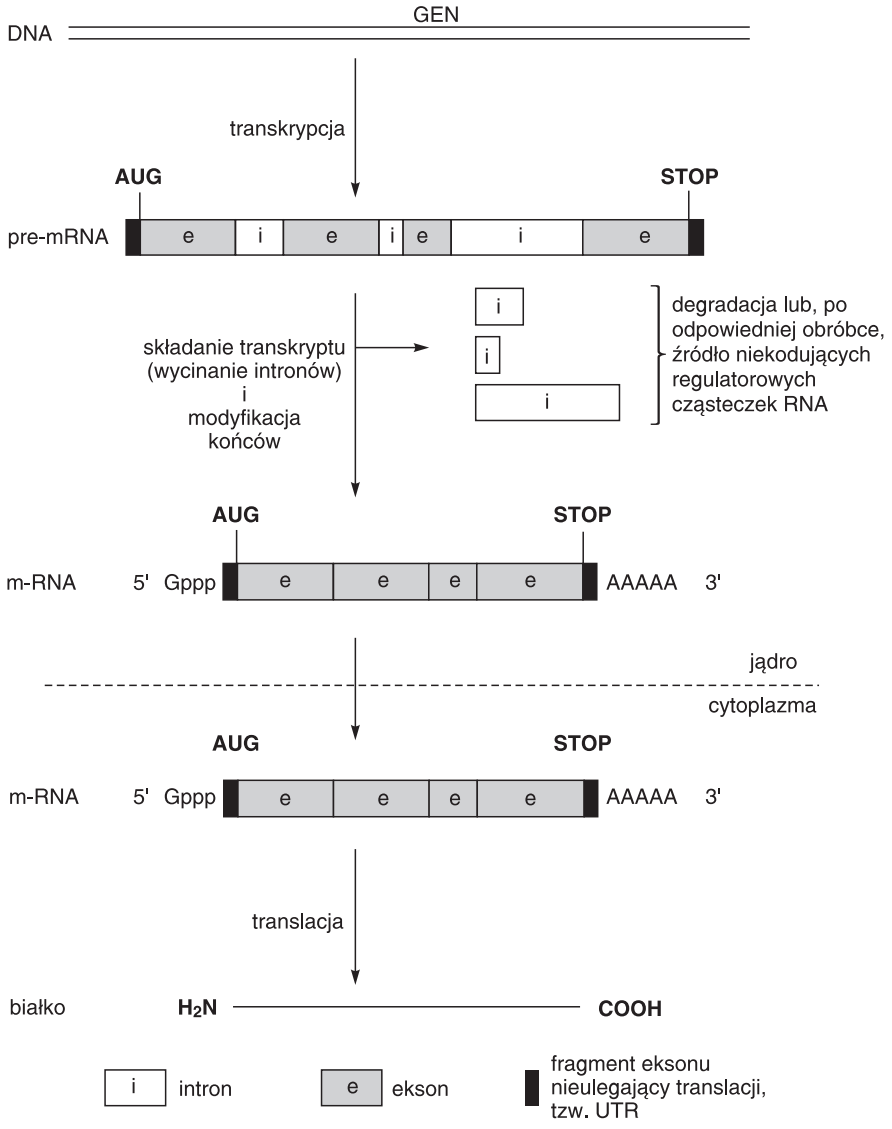
W organizmach eukariotycznych synteza RNA odbywa się w obrębie jądra komórkowego. **Transkrypcji genów** kodujących białka dokonuje specyficzna polimeraza RNA, której w jądrze komórkowym jest około 40 000 cząsteczek. Łańcuch RNA jest syntetyzowany z rybonukleotydów na matrycy, którą jest rozpleciony jednoniciowy fragment cząsteczki DNA. Naprzeciwko znajdujących się w DNA deoksyrybonukleotydów G, C, T, A, zgodnie z zasadą komplementacji, w nici RNA są wstawiane odpowiednio rybonukleotydy: C, G, A i U.

U organizmów eukariotycznych tylko w nielicznych przypadkach obserwuje się prostą zależność między sekwencją genu kodującego białko a sekwencją transkryptu. Sekwencja nukleotydów pierwotnego transkryptu (pre-mRNA) może być bowiem zmieniana w procesie dojrzewania RNA. Proces ten jest wieloetapowy i obejmuje różne typy modyfikacji transkryptu, składanie genów i niekiedy końcowe redagowanie transkryptu.

W etapie **modyfikacji** zmianom ulegają oba końce transkryptu (*ryc. II-4*). Do końca 5' zostaje przyłączona 7-metyloguanozyna, tzw. czapeczka, a do końca 3', w większości znanych transkryptów (wyjątkiem są transkrypty genów kodujących białka histonowe), ogon złożony z poli(A). Rolą czapeczki jest zabezpieczenie transkryptu przed atakiem enzymów nukleolitycznych, ułatwianie transportu transkryptu z jądra do cytoplazmy. Czapeczka odgrywa również rolę w procesie wycinania intronów oraz w inicjacji translacji. Modyfikacja końców decyduje o stabilności i trwałości transkryptu. Usunięcie czapeczki, a także stopniowe odcinanie ogona poli(A) redukuje trwałość mRNA. Niekodująca część może nieść w sobie informacje o tkankowo specyficznej trwałości transkryptu. Modyfikacje końców zachodzą w jądrze komórkowym i odbywają się mniej więcej w tym samym czasie.

W przypadku genów kodujących białka, w procesie **składania transkryptu** (ang. splicing) z pre-mRNA są wycinane fragmenty zwane intronami. Pozostałe fragmenty – eksony – są łączone ze sobą, a powstały w ten sposób mRNA zawiera ciągłą informację o strukturze peptydu, chociaż nie wszystkie eksony ulegają translacji.

Znanych jest kilka mechanizmów składania genów. Samowycinanie obserwuje się między innymi w genach mitochondrialnych. W jądrowych genach kodujących białka u *Eukaryota* w mechanizmie składania genów bierze udział wiele białek oraz specjalne klasy małych jądrowych RNA, zwanych snRNA. Odszukanie miejsca cięcia cząsteczki RNA jest ułatwione przez zachowanie na wszystkich stykach intron/ekson/intron takich samych lub bardzo podobnych sekwencji nukleotydów. Z reguły każdy intron zaczyna się od



Rycina II-4. Schemat ekspresji genu eukariotycznego kodującego białko

sekwencji GT, a kończy AG. Proces wycinania intronów jest niezwykle precyzyjny. Pominięcie lub zamiana nawet jednego nukleotydu w charakterystycznej sekwencji na styku intron/ekson czy ekson/intron jest równoznaczna z mutacją. Rolę we właściwym procesie wycinania przypisuje się tzw. miejscu rozgałęzienia (ang. branch site) znajdującemu się blisko końca każdego intronu.

Introny są różnej długości „wstawkami" w sekwencji genu. W liczącym np. 18 kpz genie pro-α-1 kolagenu znajduje się 50 różnej długości intronów. Stanowią one niekiedy znaczną część samego genu. Ponad 65% sekwencji genu insuliny to sekwencje intronowe. W genie kodującym polimerazę DNA introny stanowią 95% sekwencji genu. W genie *CFTR* jest ich 97,6%, a w genie *DMD* aż 99,4%. Introny, po wycięciu, mogą ulec degradacji albo po odpowiedniej obróbce być źródłem niekodujących regulatorowych cząsteczek RNA.

Dotychczas brak jest pełnej odpowiedzi na pytanie dotyczące funkcji sekwencji intronowych, a także tego, kiedy pojawiły się w trakcie ewolucji. Obecność intronów, ich wycinanie, wykorzystywanie alternatywnych miejsc składania genu oraz procesy tasowania czy duplikacji to mechanizmy, które obok powstawania mutacji sprzyjają tworzeniu się różnorodności molekularnej i powiększaniu zasobu informacji genetycznej.

Transkrypt, który nie przeszedł modyfikacji i obróbki, nie jest zdolny do przemieszczenia się z jądra do cytoplazmy, gdzie odbywa się właściwe odczytanie zawartej w nim informacji genetycznej.

Liczba transkryptów kodujących białka (ulegających ekspresji) stanowi jedynie niewielki procent transkryptomu. O funkcji regulatorowego RNA, szczególnie małych RNA, takich jak miRNA czy sRNA, wiemy coraz więcej, ale – jak się wydaje – w 2011 roku jesteśmy na początku drogi.

Na modyfikacji i obróbce transkryptu nie kończy się proces dojrzewania mRNA. Transkrypt może bowiem podlegać jeszcze **redagowaniu**. Proces ten został po raz pierwszy opisany dla transkryptów mitochondrialnych świdrowców, ale występuje również u roślin i zwierząt, w tym u człowieka. Wydaje się obecnie, że może on dotyczyć większej liczby transkryptów, niż wcześniej myślano. W czasie redagowania transkrypt wzbogaca się o poszczególne nukleotydy lub traci je. Proces ten zachodzi stopniowo od końca 3' do 5' i obejmuje różne części transkryptu. W wyniku redagowania mogą powstać nowe otwarte ramki odczytu, nowe miejsca startu translacji czy też sekwencje określające miejsce wycinania intronu. U świdrowców informacji niezbędnej do redagowania dostarczają krótkie, kilkudziesięcionukleotydowe tzw. naprowadzające RNA (ang. guide RNA, gRNA). Przypuszczalnie cząsteczki gRNA, stanowiąc matrycę, zgodnie z którą dokonuje się redagowanie transkryptu, współuczestniczą też w samym procesie enzymatycznej wymiany nukleotydów. Redagowanie mRNA jest jednym z mechanizmów regulacji ekspresji genów. Ponieważ proces ten zmienia się wraz ze stadium rozwoju czy z wiekiem, stopniowa utrata zdolności redagowania może być jedną z oznak starzenia się organizmu.

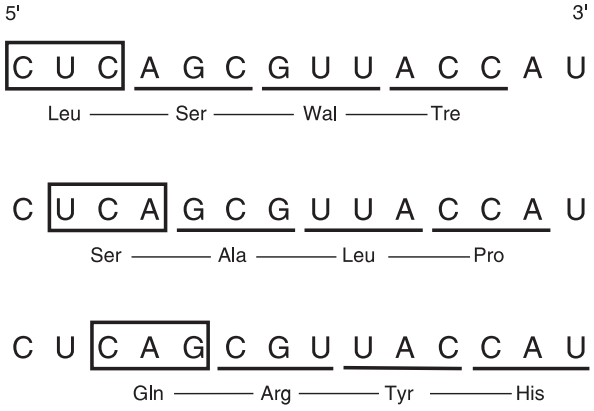
Cząsteczki kwasów nukleinowych i białek są złożone z jednostek uszeregowanych w łańcuchy. W przypadku DNA i RNA jednostkami tymi są nukleotydy, a w przypadku białek – aminokwasy. Istotą **kodu genetycznego** jest to, że sekwencja nukleotydów określa rodzaj i kolejność aminokwasów w białkach. **Kod genetyczny jest taki sam dla wszystkich organizmów żyjących na Ziemi.**

Informacja genetyczna jest cechą charakterystyczną danego organizmu i jest zawarta w DNA, dokładniej w nici kodującej. Do wyjątków należą jedynie niektóre typy wirusów przechowujące swoją informację genetyczną w RNA. W dalszym ciągu tego rozdziału sekwencje nukleotydów będą podawane zgodnie z tymi, jakie występują w RNA.

Informacja genetyczna jest zapisana w postaci trójek nukleotydów stanowiących podstawową jednostkę zwaną kodonem. Ponieważ cząsteczka kwasu nukleinowego jest polimerem czterech różnych nukleotydów, to liczba możliwych trypletów (kodonów) wynosi 64 (4^3) (patrz *ryc. XIV-1*). Spośród 20 aminokwasów wchodzących w skład białek większość jest więc kodowana przez więcej niż jeden tryplet. O takim kodzie mówi się, że jest zdegenerowany. Trzy spośród 64 trypletów: UAA, UAG i UGA nie kodują żadnego aminokwasu i sygnalizują koniec syntezy polipeptydu. Określane są one jako kodony stop lub nonsens.

Wśród trypletów należy wyróżnić trójkę AUG kodującą zwykle metioninę. Stanowi ona zazwyczaj początek zapisu informacji dla każdego białka. Właściwe jej rozpoznanie przez aparat translacyjny warunkuje prawidłowe odczytanie następujących po niej trypletów. Początkowy kodon AUG wyznacza więc trójkową ramkę odczytu (ang. open reading frame, ORF). Przesunięcie fazy w ramce o jeden lub dwa nukleotydy, np. w wyniku mutacji, prowadzi do zmiany sensu zapisu i powstania polipeptydu odmiennego niż pierwotnie kodowany (*ryc. II-5*).

Właściwe rozszyfrowanie kodu genetycznego następuje w procesie **translacji**. Obok mRNA biorą w tym udział także cząsteczki tRNA i rybosomy. Cząsteczki tRNA spełniają rolę klucza umożliwiającego rozszyfrowanie kodu zawartego w strukturze mRNA. Rybosomy są organellami komórkowymi, zbudowanymi z białek i rybosomowego RNA (rRNA). W strukturze tej jest katalizowany proces biosyntezy białek (*tab. II-1*).



Rycina II-5. Różne możliwości odczytu tej samej sekwencji nukleotydów. Informacja zawarta w RNA jest odczytywana od końca 5' do końca 3' w postaci kodonów złożonych z trzech kolejnych nukleotydów. Rodzaj nukleotydów wchodzących w skład kodonu wyznacza określony aminokwas. Przesunięcie ramki odczytu kolejno o jeden nukleotyd prowadzi do otrzymania polipeptydów różniących się całkowicie składem aminokwasów, a często do przedwczesnej terminacji translacji

Tabela II-1. Budowa rybosomu eukariotycznego

Białka				
	Podjednostka duża		Podjednostka mała	
Masa cząsteczkowa (w daltonach)	28 000 000 (60S)		1 400 000 (40S)	
Liczba	ok. 49		ok. 33	
rRNA				
Masa cząsteczkowa	5S	28S	5,8S	18S
Liczba nukleotydów	120	4700	160	1900

Ocenia się, że do prawidłowego przeprowadzenia procesu biosyntezy białek komórka eukariotyczna w czasie swojego życia musi wytworzyć około 10 milionów rybosomów. Zadanie to jest o tyle ułatwione, że w genomie człowieka znajduje się około 200 kopii genów kodujących rRNA. Geny te są zgrupowane w blokach w krótkich ramionach chromosomów 13, 14, 15, 21 i 22.

Synteza rRNA odbywa się w obrębie jąderka, wydzielonej struktury jądra komórkowego, do której wypętlają się fragmenty chromosomów kodujących zblokowane geny rRNA. W procesie syntezy rRNA, a następnie formowania się rybosomu uczestniczą inne specyficzne cząsteczki RNA – snRNA (ang. small nucleolus RNA). Przyjmuje się, że ułatwiają one przyjęcie przez rRNA odpowiedniej struktury przestrzennej i stopniowe obudowywanie jej białkami rybosomowymi.

Tworzenie łańcucha polipeptydowego odbywa się na rybosomie. Funkcja cząsteczek tRNA polega na odczytywaniu kodonów z mRNA oraz dostarczaniu aminokwasów odpowiednich dla tworzącego się polipeptydu. Odczytywanie sekwencji nukleotydów w mRNA jest rolą jednej z pętli cząsteczki tRNA. Wśród siedmiu nukleotydów wchodzących w jej skład trzy stanowią tak zwany antykodon. Sekwencja antykodonu jest komplementarna do trójki nukleotydów tworzącej kodon w mRNA.

Proces syntezy łańcucha polipeptydowego można podzielić na trzy etapy: inicjację, elongację i terminację. W czasie **inicjacji** dochodzi do stopniowego uformowania się kompleksu mRNA–rybosom –inicjatorowy tRNA. Inicjatorowym tRNA jest specyficzna cząsteczka przenosząca metioninę, której antykodon rozpoznaje na mRNA początkową trójkę AUG. Właściwa budowa i wydłużanie łańcucha polipeptydowego następuje w procesie **elongacji**. Aminokwasy dostarczane przez odpowiedni tRNA są dodawane jeden po drugim zgodnie z informacją wyznaczoną przez kolejne kodony w mRNA. Wiązanie peptydowe między aminokwasami powstaje z udziałem enzymu – transferazy peptydylowej, której katalitycznym komponentem jest rRNA. Proces elongacji powtarza się cyklicznie, a powstający polipeptyd wydłuża się. Sygnałem dla **terminacji** translacji jest sekwencja zasad zawierająca jeden lub kilka kodonów nonsens. Jak wspomniano wyżej, translacja rozpoczyna się zazwyczaj od trójki AUG kodującej metioninę. Nie oznacza to jednak, że wszystkie białka rozpoczynają się od tego aminokwasu, jest on bowiem zazwyczaj usuwany.

Chociaż proces odczytywania mRNA charakteryzuje się dużą specyficznością, zdarzają się jednak błędy. Szacuje się, że na skutek mutacji powstałych w genach kodujących tRNA i białka rybosomowe jeden na 1000 do 10 000 aminokwasów jest podstawiony błędnie. Podczas lawinowego wręcz wytwarzania białek, odbywającego się równocześnie na wielu rybosomach, nie ma to istotnego znaczenia. Na przykład w organizmie człowieka w ciągu sekundy jest wytwarzanych 5×10^{14} kopii hemoglobiny, białka składającego się z 574 aminokwasów.

Różnice w strukturze białek i RNA biorących udział w procesach transkrypcji i translacji u *Prokaryota* i *Eukaryota* są przyczyną różnic między innymi we wrażliwości na antybiotyki. Znalazło to szerokie zastosowanie w biologii i medycynie (*tab. II-2*). Umożliwia bowiem wybiórcze hamowanie rozwoju jednych organizmów bez ingerencji w rozwój drugich.

Wyjaśnienie mechanizmu transkrypcji stwarza nowe możliwości specyficznej ingerencji w proces jej regulacji. Poznanie w ciągu najbliższych lat białek uczestniczących w procesie transkrypcji określonych genów to nadzieja na produkcję nowej generacji leków do walki z nowotworami, chorobami serca, układu odpornościowego, a także infekcjami wirusowymi.

Tabela II-2. Inhibitory hamujące transkrypcję lub translację

Nazwa inhibitora	Zakres działania		Miejsce działania
	Prokaryota	*Eukaryota*	
Tetracyklina	+		blokuje wiązanie naładowanego tRNA do miejsca A na rybosomie
Streptomycyna	+		hamuje inicjację syntezy białka
Chloramfenikol	+		blokuje transferazę peptydylową
Erytromycyna	+		blokuje przesuwanie się rybosomu po matrycy
Ryfampicyna	+		blokuje inicjację transkrypcji
Cykloheksamid		+	blokuje transferazę peptydylową
α-Amanityna		+	blokuje syntezę mRNA
Puromycyna	+	+	prowadzi do przedwczesnej terminacji polipeptydu
Aktynomycyna D	+	+	wiążąc się do DNA, blokuje ruch polimerazy RNA

II.1.3. Regulacja ekspresji

Regulacja ekspresji, regulacja działania genów i ich produktów zachodzi w komórce zarówno na poziomie DNA, RNA, jak i białka. U *Prokaryota* system inicjacji transkrypcji obejmuje zasadniczo jeden fragment genu, położony w sąsiedztwie części kodującej, nazywany promotorem. Polimeraza RNA wiąże się do DNA i rozpoczyna transkrypcję od promotora, a regulacja działania genu – liczba powstających transkryptów – jest funkcją liczby przyłączanych do niego cząsteczek polimerazy. Polimeraza rozpoznaje sekwencje promotorowe genu dzięki podjednostce „sigma".

Eukariotyczny promotor składa się z kilku części regulatorowych. Miejsce startu transkrypcji poprzedza promotor rdzeniowy pełniący rolę podobną do promotora bakteryjnego. W obrębie części rdzeniowej występuje najczęściej sekwencja bogata w pary AT (TATA-box) oraz sekwencja CAAT (CAAT-box). Inne sekwencje regulacyjne są umiejscowione poza rdzeniem promotora. Należą do nich: wzmacniacze (ang. enhancers) i wyciszacze (ang. silencers). Regiony regulacyjne mogą być położone w znacznej odległości, niekiedy nawet kilku tysięcy nukleotydów, od części kodującej genu. Rozpoczęcie procesu transkrypcji, jego szybkość i czas trwania są regulowane przez białkowe czynniki transkrypcyjne przyłączające się do sekwencji regulatorowych. U *Eukaryota* sekwencja promotora nie jest bezpośrednio rozpoznawana przez polimerazę, lecz przez wspomniane czynniki transkrypcyjne. Zapoczątkowywany jest w ten sposób kompleks transkrypcyjny, który obok polimerazy RNA składa się z około 50 różnych białek. Znajdują się w nim białka rozpoznające sekwencję TATA, specyficzne aktywatory, represory spowalniające transkrypcję itp. Eukariotyczna „sigma" jest więc kompleksem białkowym.

Opisanemu systemowi regulacji transkrypcji nie podlega pewna klasa genów, zwanych genami metabolizmu podstawowego (ang. housekeeping genes), których produkty są niezbędne do ciągłego przebiegu procesów życiowych komórki. W genach tych polimeraza rozpoczyna transkrypcję od sekwencji bogatej w pary GC rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny SP1.

System regulacji działania genów może mieć strukturę hierarchiczną. Najbardziej jest to widoczne w procesach genetycznej regulacji różnicowania się organizmów tkankowych. Każdy organizm zwierzęcy powstaje z pojedynczej, zapłodnionej komórki jajowej, która dzieląc się wielokrotnie, różnicuje się, tworząc w pełni ukształtowany organizm złożony z odmiennych i różnie umiejscowionych tkanek. Jak się wydaje, geny kierujące procesem różnicowania (np. geny homeotyczne) są podobne zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców. Prawidłowa funkcja genów homeotycznych polega na przypisaniu komórkom, znajdującym się w różnych częściach tworzącego się organizmu, określonej orientacji przestrzennej. Wydaje się, że liniowy porządek występujących w blokach genów homeotycznych (od 5' do 3') odpowiada osiowemu porządkowi różnicującego się organizmu (typu głowa–ogon). Produktami genów homeotycznych

są białka wiążące się z DNA, uczestniczące w procesie regulacji genów.

O ile opisywane mechanizmy regulacji transkrypcji dotyczyły konkretnych genów czy też ich fragmentów regulatorowych, o tyle metylacja DNA nie jest tak specyficzna. Dotyczy bowiem sekwencji występujących w genomie bardzo często. Może więc dotyczyć regulacji grupy genów, a nawet całego chromosomu (inaktywacja jednego z chromosomów X). Metylacja zaliczana jest do tzw. mechanizmów epigenetycznych; termin ten stworzono początkowo jedynie dla tej części regulacji, która jest związana z rozwojem zarodka. Proces metylacji/demetylacji DNA jest powiązany z innymi regulacyjnymi mechanizmami epigenetycznymi, takimi jak np. acetylacja/deacetylacja histonów, w wyniku którego następują zmiany struktury chromatyny, co umożliwia lub blokuje aktywność transkrypcyjną poszczególnych fragmentów chromosomów.

Po zakończeniu translacji wiele białek przechodzi swoistą potranslacyjną modyfikację, polegającą między innymi na metylacji, fosforylacji lub glikozylacji cząsteczki. Liczne białka są syntetyzowane w formie prekursorów. W tym przypadku modyfikacja polega na odcięciu fragmentu peptydu. Potranslacyjna modyfikacja może mieć również charakter swoistego procesu składania białka, analogicznego do składania RNA. Wykazano, że niektóre peptydy mają zdolność autokatalitycznego usuwania ze swojej struktury fragmentów zwanych inteinami (analogia do intronów). Trudno powiedzieć, jak powszechny jest to proces i jakie funkcje pełnią w komórce inteiny. Niewątpliwie proces składania białka zwiększa różnorodność produktów kodowanych przez dany gen.

Prawidłowa funkcja białka jest związana z przyjęciem odpowiedniej struktury drugo- i trzeciorzędowej. Do niedawna panowało przekonanie, że pełna informacja o prawidłowym pofałdowaniu białka jest zawarta w sekwencji nukleotydów kodujących odpowiednie aminokwasy. Mówiono nawet o drugim kodzie genetycznym. Okazało się jednak, że do przyjęcia właściwej konformacji niezbędna jest obecność specyficznej klasy białek. Wśród nich wyróżnia się enzymy katalizujące fałdowanie oraz białka opiekuńcze (towarzyszące) (ang. chaperone). Opisano kilka klas tych białek. Białka opiekuńcze ułatwiają właściwe fałdowanie innych białek, ale nie jest to proces aktywny. Nie towarzyszy mu powstawanie wiązań kowalencyjnych, białka te nie wchodzą również w skład fałdujących się polipeptydów. Białka opiekuńcze biorą udział także we wszystkich etapach metabolizmu komórkowego, w ochronie przed stresem (np. podwyższeniem temperatury), a także w „naznaczaniu" białek przeznaczonych do degradacji. Charakteryzują się między innymi dużą konserwatywnością sekwencji aminokwasów.

Swoistym mechanizmem regulacji ekspresji genu jest tzw. wyciszanie. Wyciszanie ekspresji danego genu może się dokonać poprzez degradację transkryptu, blokowanie translacji lub indukcję mechanizmów epigenetycznych, takich jak metylacja DNA.

II.1.3.1. Wyciszanie ekspresji genu

Jedna z postaci potranskrypcyjnego mechanizmu wyciszania ekspresji genów jest nazywana interferencją RNA (ang. RNA interference, RNAi). Szczególną rolę w tym procesie pełni klasa cząsteczek RNA zaliczanych do niekodującego RNA (niekodujących białek) (ang. noncoding RNA, ncRNA).

Na etapie transkrypcji regulacja ekspresji odbywa się poprzez degradację transkryptu. W procesie tym uczestniczą tzw. siRNA (ang. small interfering RNA). siRNA to dwuniciowy RNA o wielkości 21–23 nukleotydów, który powstaje w wyniku cięcia długich dwuniciowych fragmentów RNA przez RNazy specyficzne wobec tego typu cząsteczek. W kompleksie z białkami siRNA rozplata się i teraz już jednoniciowy RNA łączy się z komplementarnymi fragmentami transkryptu. Uruchamiany proces degradacji transkryptu zostaje ostatecznie dokonany przez specjalny kompleks białkowy.

W blokowaniu translacji uczestniczą inne cząsteczki niekodującego RNA. Są nimi miRNA. W odróżnieniu od siRNA, miRNA, chociaż jednoniciowy, tworzy struktury komplementarne. Proces blokowania translacji polega na połączeniu wraz z kompleksem białkowym z nieulegającym translacji końcem 3' transkryptu (3' UTR) i nie jest aż tak specyficzny, jak komplementacja siRNA. miRNA powstaje również z większych prekursorowych cząsteczek RNA. Na terenie cytoplazmy przyjmują one strukturę „spinki do włosów". Wykazano, że siRNA i miRNA często współuczestniczą w wyciszaniu genów.

Ewolucyjnie mechanizm RNAi rozwinął się jako jeden z elementów obrony przed infekcją wirusową, również jako mechanizm eliminujący rearanżacje genomu związane z przemieszczaniem się transpozonów. Jak się wydaje, poza wyciszaniem ekspresji genów RNAi może również odgrywać rolę w degradacji transkryptów zawierających przedwczesny kodon terminacji translacji (ang. nonsense-mediated decay, NMD).

Przykładem wyciszania ekspresji poprzez indukcję procesów epigenetycznych jest proces inaktywacji jednego z chromosomów X u kobiet. Proces ten jest sterowany przez gen XIST zlokalizowany na nieaktywnym transkrypcyjnie chromosomie X. Produktem tego genu jest specyficzny ncRNA, którego powstanie zapoczątkowuje proces inaktywacji innych genów na tym chromosomie.

II.1.3.2. Piętnowanie genomowe

Informacja genetyczna u człowieka jest sumą informacji przekazanych przez matkę i ojca. Komórki naszego organizmu są diploidalne. Stwierdzenie to w pełni odnosi się jednak tylko do kobiet. Tylko u kobiet bowiem każdy z alleli ma swój odpowiednik (22 pary autosomów i dwa chromosomy X). U mężczyzn występowanie dwóch różnych chromosomów płci (X i Y) powoduje, że większość genów kodowanych na tych chromosomach ulega monoallelicznej ekspresji. Monoalleliczna ekspresja występuje często w przypadku *loci* autosomalnych, gdy z dwóch alleli danej pary tylko jeden ulega ekspresji. Ewolucyjnie musiał więc powstać mechanizm równoważący dawkę genu. Takim mechanizmem jest piętnowanie genomowe (ang. genomic imprinting). Mechanizm ten nie jest związany ze zmianą sekwencji DNA, ma więc charakter epigenetyczny i potencjalnie dotyczy odwracalnych modyfikacji DNA. Mechanizm wyciszania alleli w piętnowaniu genomowym polega z reguły na metylacji fragmentu DNA. Piętnowanie może mieć charakter losowy, jak u kobiet w przypadku inaktywacji jednego z chromosomów X, lub rodzicielski (ang. parental genomic imprinting), gdy wykluczanie poszczególnych alleli jest uzależnione od ich ojcowskiego bądź matczynego pochodzenia.

Uważa się, że brak ekspresji informacji genetycznej w określonych *loci* pochodzenia ojcowskiego jest odpowiedzialny za następujące zespoły wad genetycznych człowieka: Pradera–Willego (chromosom 15q), kociego krzyku (5p), Millera–Diekera (17p), Wolfa–Hirschhorna (4p) czy Beckwitha–Wiedemanna (11p). Brak ekspresji w określonym *locus* informacji pochodzenia matczynego jest odpowiedzialny za występowanie zespołów Angelmana (15q), Di George'a (22q) czy zespołu włosowo-nosowo-paliczkowego typu II (ang. trichorhino-phalangeal syndrome) (8q). Defekt w piętnowaniu genomowym wykazano także w wielu chorobach nowotworowych, w tym zleżnych od ekspresji niektórych onkogenów (por. rozdział X).

II.1.4. Gen

Kolejnym etapom rozwoju genetyki towarzyszyły różne definicje genu. Trudno jest obecnie podać prosty opis, w którym jest zawarta pełna wiedza, jaką na ten temat posiadamy. Najogólniej gen to fragment kwasu nukleinowego, DNA lub RNA (jak to jest u niektórych wirusów), w którym jest zapisana informacja o kodowanym produkcie. W swej strukturze gen obok fragmentów kodujących (eksonów) (*tab. II-3*) może zawierać elementy niekodujące, takie jak promotor czy introny.

W zasadzie jeden gen koduje jeden produkt, chociaż i od tej zasady znanych jest wiele odstępstw. Przykładem może być kodowanie różnych produktów z wykorzystywaniem odmiennych faz w tej sa-

Tabela II-3. Wielkość niektórych genów człowieka kodujących białka*

Produkt genu	Wielkość (kpz)	mRNA (kpz)	Liczba eksonów
α-Globina	0,8	0,5	3
β-Globina	1,5	0,6	3
Pro-α 1 kolagen I	18	5,0	51
Albumina	25	2,1	14
Receptor LDL	45	5,5	18
Hydroksylaza fenyloalaninowa	90	2,4	12
Czynnik VIII	186	9,0	26
CFTR	250	6,5	27
Neurofibromina	350	12,0	60
Dystrofina	2000	16,0	79

* Informacje o genach człowieka są zgromadzone w bazie danych np.: (http://www.ensembl.org/index.html; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome).
** regulator przewodnictwa przezbłonowego w mukowiscydozie.

mej ramce odczytu lub też kodowanie drugiego produktu w intronie danego genu. Geny mogą kodować informacje o RNA (np. tRNA, rRNA, snRNA) lub za jego pośrednictwem o białku.

Istnieją także wyjątki od zasady, że gen zajmuje zawsze stałe miejsce w chromosomie. Tak zwane transpozony, czyli fragmenty DNA mające zdolność przemieszczania się po chromosomie, liczą niekiedy kilka tysięcy par nukleotydów i mogą kodować różne geny. Skutkiem „nieuprawnionego" włączenia się transpozonu w chromosom może być inaktywacja genu, a także jego zwielokrotniona i wyzwolona spod kontroli ekspresja. Inny przykład zmienności struktury genów jest związany z procesem różnicowania się limfocytów. Sposób powstawania ogromnej liczby specyficznych przeciwciał został wyjaśniony, gdy okazało się, że układ segmentów, z których są składane geny kodujące przeciwciała, może ulegać różnym przekształceniom. Prowadzi to w konsekwencji do zmian w zapisie genetycznym w komórkach układu odpornościowego, czyli zmian w strukturze genu.

Wielkość genu może również ulegać pewnym modyfikacjom. W sekwencji nukleotydów genu *FMR1*, którego defekt prowadzi do jednej z postaci niedorozwoju umysłowego (zespół FraX), można wyróżnić od 6 do 54 powtórzeń trójki nukleotydów CGG. Zmienność ta ma charakter populacyjny, a jej mechanizm nie jest w pełni wyjaśniony.

Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat zmieniały się poglądy co do liczby genów w genomie człowieka. Do końca 1995 roku znane były sekwencje (sekwencje eksonowe i flankujące je sekwencje intronów) około 5000 genów człowieka. Oceniano, że do zakodowania informacji genetycznej o podstawowych białkach potrzeba około 80 tysięcy genów. Wyniki sekwencjonowania chromosomu 21 i 22 podały w wątpliwość te szacunki. Ekstrapolując „nasycenie" genami stwierdzone dla tych chromosomów, odpowiednio 225 i 545, należało przyjąć, że w genomie człowieka znajduje się łącznie około 40 tysięcy genów. Dane te byłyby zgodne z wynikami określającymi liczbę genów na podstawie liczby tych fragmentów genomu, które służą jako matryce do wytwarzania RNA. Wydawało się jednak, że chromosomy 21 i 22 charakteryzują się małą liczbą kodowanych genów. Wskazywać na to mogło np. zagęszczenie genów kompleksu MHC na chromosomie 6. Ostatecznie na podstawie ogłoszonych (2001 r.) wyników roboczej wersji sekwencji genomu, uzyskanych w ramach połączonych wysiłków HUGO i organizacji prywatnych, przyjmuje się, że całkowita liczba genów kodujących białka wynosi około 25 tysięcy.

Z dogmatów obowiązujących w biologii pozostało niewiele. Nadal uważa się, że informacja o strukturze białek zakodowana jest w kwasach nukleinowych. Kierunek przekazywania informacji odbywa się więc od kwasów nukleinowych do białek, a nie odwrotnie. Trójkowy kod genetyczny jest kodem uniwersalnym, obowiązującym w całym świecie ożywionym. Różnice występują jedynie w zapisie genetycznym. W niektórych organizmach, a także w mitochondriach drożdży i ssaków wykazano bowiem, że określone kodony wyznaczają inne aminokwasy, niż to jest zazwyczaj. Jednak i w tych przypadkach, jak się wydaje, proces redagowania transkryptów przywraca zasady uniwersalnego kodu genetycznego. **Uniwersalność kodu genetycznego oznacza, że wszystkie żyjące organizmy pochodzą od wspólnego przodka.**

II.1.5. Świat RNA

RNA, od początku gdy tworzyły się podstawy wiedzy o kodowaniu i ekspresji genów, był obecny we wszystkich rozważaniach. Jego rolę ograniczano jednak tylko do pośredniczenia w przekazywaniu informacji. Widziano w nim głównie matrycę do syntezy białka. Już wtedy jednak RNA niekodujący zaznaczył swoją obecność chociażby w postaci tRNA i rRNA.

Z pewnym zaskoczeniem odkryto zdolności katalityczne niektórych cząsteczek RNA. Rybozymy to termin, którym określono RNA wykazujący aktywność enzymatyczną. Może być ona skierowana na własną cząsteczkę (autokataliza) lub na inne cząsteczki RNA. Niekiedy kompleks enzymatyczny jest tworzony łącznie ze specyficznymi białkami. Autokatalityczną aktywność wykazują małe wirusy RNA. Samowycinanie jest cechą pewnej klasy intronów, zachodzi też ono w czasie redagowania RNA. Funkcje w tworzeniu wiązań peptydowych przypisuje się RNA związanemu z białkami w takim kompleksie, jakim jest rybosom.

Rola, jaką obecnie przypisuje się RNA, a dokładniej ncRNA, odmieniła się radykalnie. ncRNA nie stanowi jednolitej grupy cząsteczek ani pod względem funkcji, ani wielkości, ale udowodniono jego udział w takich procesach, jak regulacja transkrypcji, replikacja DNA, składanie RNA, jego modyfikacja i edycja, stabilizacja transkryptu oraz w procesach translacji i degradacji białek. RNA pełni kluczową rolę także w procesach różnicowania i mechanizmach epigenetycznych. Możliwość komplementacji nici kwasów nukleinowych jest bo-

wiem mechanizmem dużo bardziej precyzyjnym niż oddziaływania kwasy nukleinowe–białka. W tej sytuacji nie dziwi wysoki stopień konserwatywności genomu w części kodującej ncRNA.

Jak wspomniano wcześniej, ncRNA jest wysoce heterogenną klasą cząsteczek zarówno funkcjonalnie, jak i strukturalnie. ncRNA kodowany jest głównie w części genomu nie tak dawno określanej mianem DNA śmieciowego. ncRNA działa z reguły w kompleksie z białkami. Być może było to powodem niedostrzegania roli RNA. Szereg metod umożliwiających zarówno identyfikację, jak i badanie funkcji białek zakłada bowiem na wstępie całkowitą ekstrakcję kwasów nukleinowych. Uczestnicząc u *Eukaryota* w procesie składania transkryptów (wycinaniu intronów), RNA mógł odegrać rolę w procesach różnicowania sekwencji, a więc i jej ewolucji.

Życie na Ziemi powstało około 3,5 miliarda lat temu. Jak się wydaje, warunkiem jego powstania było uzyskanie przez pierwotne organizmy zdolności do powielania własnej informacji genetycznej. O ile w laboratorium można odtworzyć warunki pradawnej atmosfery ziemskiej i powstawanie w niej określonych związków organicznych, o tyle brak jest w dalszym ciągu przekonujących koncepcji, czym był pierwotny materiał genetyczny i jakie były zasady jego replikacji. Pierwotny system replikacji mógł mieć charakter nieorganiczny. Raczej nie był oparty na białkach, bo nie mają one zdolności do replikacji. Wielu uczonych uważa, że taką pierwotną cząsteczką niosącą informację genetyczną, a jednocześnie mającą funkcje katalityczne był RNA. Zgodnie z tą hipotezą DNA, obecnie powszechnie kodujący informację genetyczną, jako cząsteczka stabilniejsza jest kolejnym, po RNA, etapem w ewolucji informacji genetycznej. Niezależnie jednak od tego, jaki był pierwszy system kodowania i powielania informacji genetycznej, od czasu jego powstania należy datować życie na Ziemi.

II.2. Genom człowieka

Informacja genetyczna człowieka jest zapisana w genomach jądrowym i mitochondrialnym. Genom mitochondrialny jest zamknięty w kolistej cząsteczce DNA, a jego wielkość stanowi około 0,0005% genomu jądrowego. Genom jądrowy liczy ponad 3 miliardy nukleotydów i jest podzielony na 24 chromosomy. Genomy jądrowy i mitochondrialny różnią się nie tylko umiejscowieniem w komórce, wielkością, liczbą i rodzajem kodowanych genów, ale podlegają również odmiennym zasadom dziedziczenia. Informacje o genomie mitochondrialnym zamieszczono w rozdziałach opisujących zasady dziedziczenia, choroby mitochondrialne i analizę DNA w medycynie sądowej.

II.2.1. Genomika

Początek lat dziewięćdziesiątych XX wieku przyniósł decyzje dotyczące pełnego poznania genomu człowieka. Ten światowy program był koordynowany przez Human Genome Organization (HUGO). Skalę przedsięwzięcia, na tamte lata, mogą zobrazować następujące informacje. Do końca 1997 roku tylko dla kilku bakterii, w tym: *M. genitalium* (0,58 Mpz), *Haemophilus influenzae* (1,83 Mpz), *Methanococcus jannaschii* (2 Mpz), *Staphyloccocus aureus* (2,8 Mpz), udało się poznać pełną genomową sekwencję nukleotydów. W genomie *M. genitalium* zidentyfikowano 517 genów, w genomie *H. influenzae* 1743, a w *S. aureus* – 2400. W porównaniu z tymi organizmami genom człowieka jest większy o trzy rzędy wielkości (*tab. II-4*)[1], a liczbę kodowanych w nim genów szacuje się na około 25 tysięcy.

Przyspieszenie prac nad sekwencjonowaniem genomu ludzkiego było związane z zaangażowaniem kapitału prywatnego. Do 1995 roku w ludzkich bankach genów znajdowało się niespełna

Tabela II-4. Liczba genów kodujących białka u różnych organizmów

Gatunek	Wielkość genomu $\times 10^6$ pz	Liczba chromosomów	Średnia wielkość genu (kpz)	Liczba genów
Escherichia coli	4,63	1	1,2	3025
Saccharomyces cerevisiae	14	16	1,7	6702
Drosophila melanogaster	170	8	11,3	ok. 13 000
Homo sapiens	3000	46	16,3	ok. 25 000

[1] Pierwszym genomem, jaki w pełni zsekwencjonowano, był liczący 5386 pz chromosom bakteriofaga Φ X174 (1977 r.), kolejnym był złożony z 48 502 pz genom bakteriofaga λ (1982 r.).

12 Mpz sekwencji nukleotydowych, co stanowi około 0,4% całego genomu. Tylko 19 spośród znanych sekwencji DNA miało większą długość niż 50 kpz. Postęp dokonany w ciągu 1996 roku był stosunkowo niewielki. Znana była sekwencja około 1% genomu. W 1999 roku znanych już było 188,9 Mpz, co stanowiło 6,3% całego genomu. W 2000 roku opublikowano prawie pełną sekwencję dwóch najmniejszych chromosomów człowieka: 21 i 22. Zapowiedziano opublikowanie sekwencji DNA chromosomów 5, 16 i 19. Podano również informację o zakończeniu prac nad roboczą wersją genomu.

Ustalony zapis rodzaju i kolejności nukleotydów w cząsteczce ludzkiego DNA miał charakter modelowy. Można się spodziewać, że w krótkim czasie po 2010 roku sekwencja nukleotydów w genomowym DNA będzie znana dla tysięcy osób. Poznanie rodzaju i zakresu istniejących różnic umożliwi między innymi pełną charakterystykę genomu: określenie dodatkowych markerów genetycznych przydatnych w mapowaniu genów, w badaniach z zakresu patologii molekularnej i w badaniach prognostycznych. W ramach tego typu projektów przewiduje się podjęcie systematycznych badań grup etnicznych i populacji izolowanych.

Rok 2000 zaowocował opublikowaniem sekwencji genomowej 30 organizmów, w tym nicienia *Caenorhabditis elegans* (97 Mpz) i rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* (125 Mpz). W 2005 roku poznaliśmy między innymi sekwencję genomu psa i szympansa. W 2010 roku znane już były genomy ponad 200 organizmów (http://www.genomesize.com/), w tym 25 samych tylko różnych gatunków ssaków. (http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_sequenced_eukaryotic_genomes). Poznaliśmy również genom neandertalczyka.

Wynikom identyfikacji sekwencji kolejnych genomów towarzyszy napływ olbrzymiej ilości informacji. Częściową odpowiedzią na konieczność przetwarzania napływających danych są zarówno nowe technologie, jak i powstanie odrębnej gałęzi genetyki molekularnej, jaką jest genomika. Genomika porównawcza już obecnie przynosi odpowiedź na szereg podstawowych pytań z zakresu ewolucji genomu, pochodzenia i roli poszczególnych genów. Celem genomiki funkcjonalnej jest badanie nie tyle funkcji danego genu, ile organizacji i kontroli dróg metabolicznych odpowiadających za biochemię i fizjologię komórki. Oznacza to równocześnie badanie ekspresji wielu genów na poziomie tworzonych transkryptów (analiza transkryptomu). Kompleksowymi badaniami ekspresji białek i ich wzajemnych oddziaływań zajmuje się, z kolei, proteomika. Nie sposób w tym kontekście nie wymienić bioinformatyki, a także badań *in silico*, które same w sobie stanowią wydzieloną dziedzinę umiejętności.

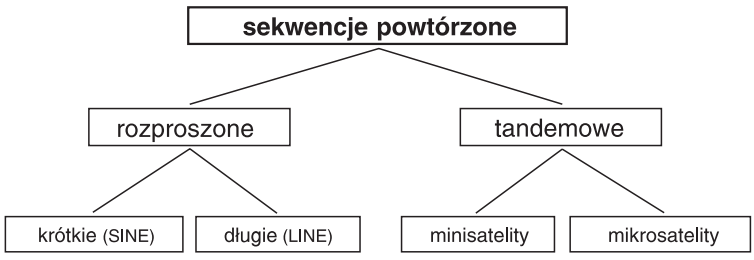
Tabela II-5. Struktura genomu człowieka

Typ sekwencji	Część genomu (%)
Unikatowe (geny kodujące białka)	~1,5
Geny RNA	~4
Powtórzone	~45
Inne	~50

II.2.2. Struktura genomu

Początkowe trudności w sekwencjonowaniu genomu człowieka odzwierciedlały w pewnym stopniu zróżnicowanie jego struktury (*tab. II-5*). Szczególnie poznanie długich powtarzających się sekwencji nukleotydów, niezależnie od przyjętej strategii sekwencjonowania, odwlekło moment opublikowania pierwszego pełnego zapisu informacji genetycznej.

Sekwencje unikatowe, wśród których znajdują się geny kodujące białka, stanowią jedynie około 1,5% całego genomu. Sekwencje te to swoistego rodzaju wyspy w morzu sekwencji tylko częściowo znanej funkcji. Rzadko spotyka się zgrupowania genów, takich jak np. kodujące rybosomowy



Rycina II-6. Rodzaje sekwencji powtórzonych

Tabela II-6. Podstawowe symbole stosowane do opisu kariotypu (ISCN, 2016)

add	dodatkowy materiał chromosomowy nieznanego pochodzenia
cen	centromer
del	delecja
der	pochodna przegrupowania chromosomowego
dic	chromosom dicentryczny (zawierający dwa centromery)
dn	*de novo*, aberracja chromosomowa, która nie została odziedziczona
dup	duplikacja
fra	miejsce łamliwe
h	heterochromatyna
i	izochromosom
ins	insercja
inv	inwersja lub odwrócona duplikacja
mar	chromosom markerowy
mat	pochodzenie matczyne
mos	mozaikowy
p	krótkie ramię chromosomu
pat	pochodzenie ojcowskie
q	długie ramię chromosomu
r	chromosom pierścieniowy
rob	translokacja robertsonowska
rec	chromosom zrekombinowany
s	satelity
subtel	region subtelomerowy chromosomu
t	translokacja
ter	terminalny lub telomer
upd	disomia jednorodzicielska
var	wariant lub zmieniony
+/–	przed numerem chromosomu oznacza dodanie lub utratę całego chromosomu, po numerze chromosomu oznacza dodanie lub utratę jego części
:	złamanie chromosomu
::	złamanie i ponowne połączenie
–>	określa opisywany fragment chromosomu „od–do”

RNA. Geny te występują bowiem w blokach w pięciu różnych chromosomach człowieka.

Sekwencje powtórzone, to znaczy występujące w genomie w wielu kopiach, charakteryzują się określoną wielkością, rodzajem i układem nukleotydów. Stanowią one około 40% genomu. Sekwencje te z reguły nie kodują białek. Wyróżnia się wśród nich sekwencje rozproszone i sekwencje tandemowe (*ryc. II-6*).

Sekwencje rozproszone dzieli się z kolei na sekwencje krótkie i długie. Sekwencje krótkie (ang. short interspersed nuclear element, SINE) o długości 130–300 nukleotydów są rozproszone w tysiącach kopii w całym genomie. Na przykład sekwencja Alu o długości około 300 nukleotydów jest „porozrzucana” po genomie w 1 milionie kopii. Sekwencja ta, zaliczana niekiedy do transpozonów, czyli elementów zdolnych do przemieszczania się po genomie, stanowi łącznie około 10% całego genomu. Jej występowanie jest charakterystyczne dla naczelnych i, jak się wydaje, może być podatna na redagowanie RNA. Sekwencję Alu zlokalizowano również w intronach genów kodujących α- i β-globinę, hormon wzrostu czy apolipoproteinę B. W liczącym 17 kpz genie inhibitora C1 (mutacje tego genu są odpowiedzialne za dziedziczny obrzęk naczynioruchowy) zlokalizowano aż 17 sekwencji Alu.

Długie sekwencje rozproszone (ang. long interspersed nuclear element, LINE) o wielkości około kilku tysięcy nukleotydów reprezentują, podobnie jak sekwencja Alu, klasę sekwencji pochodzących od transpozonów. Szacuje się, że stanowią one około 20% genomu.

Sekwencje tandemowe, nazywane również satelitarnymi, to zblokowane seryjne powtórzenia krótkiej sekwencji nukleotydów. Dzieli się je na minisatelity i mikrosatelity, które różnią się między sobą liczbą nukleotydów zawartych w powtarzającym się motywie. Nazwa „sekwencje satelitarne” pochodzi od jednorodnej (satelitarnej) frakcji DNA obserwowanej w gradientach gęstości w czasie frakcjonowania genomowego DNA.

Minisatelity to zblokowane, zwielokrotnione kopie, w których powtarzający się motyw zawiera od 10 do 100 nukleotydów. Szacuje się, że w genomie człowieka znajduje się kilka tysięcy *loci* dla minisatelitów. Występują one w obrębie genów takich jak: gen insuliny, kolagenu typu II, mieliny, apolipoproteiny, α-globiny oraz w specyficznych *loci* zlokalizowanych poza genami struktury. Niektóre sekwencje powtórzone ulegają transkrypcji, brak jednak dowodu na ich ekspresję. Wyjątkiem jest nadzmienny *locus MUC1*, który koduje wysoce polimorficzną mucynę. Biologiczna funkcja minisatelitarnego DNA nie jest znana. Jedna z hipotez mówi, że ze względu na położenie sekwencje te mogą mieć znaczenie w tworzeniu par chromosomów homologicznych i rekombinacji. Sekwencjom powtórzonym przypisuje się również wpływ na

strukturę chromosomów, trwałość transkryptów oraz udział w regulacji ekspresji genów. Spośród sekwencji minisatelitarnych rekrutują się tzw. sondy Jeffreya wykorzystywane, kilkanaście lat temu, w badaniu pokrewieństwa członków danej rodziny.

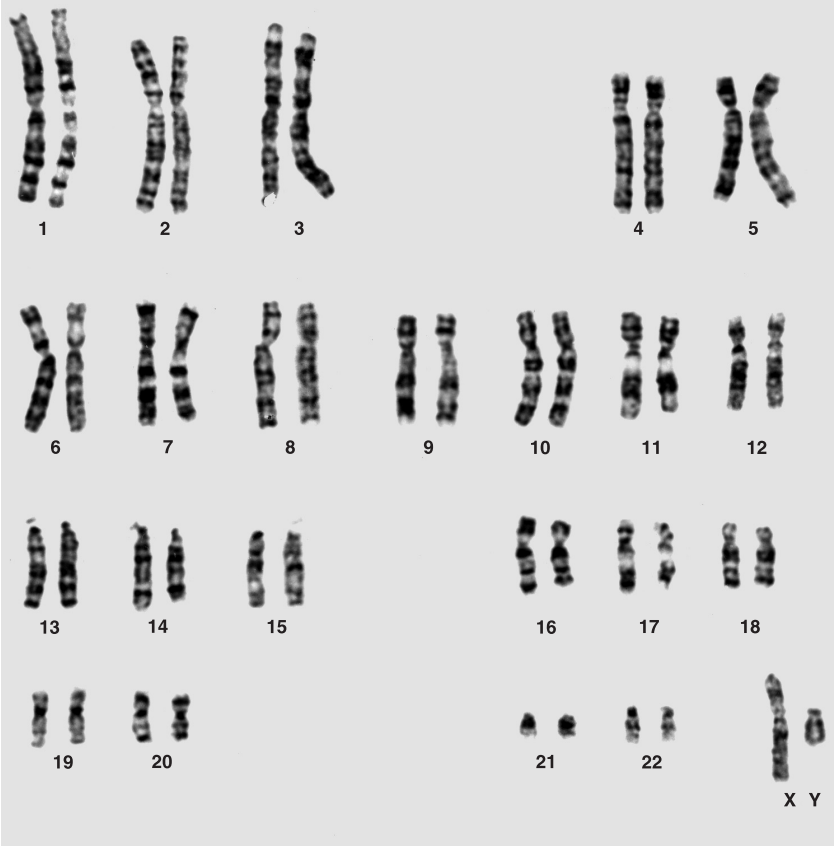
Mikrosatelity to sekwencje tandemowe, w których podstawowy motyw zawiera od 1 do 6 nukleotydów i powtarza się w pojedynczym *locus* od 5 do 100 razy. Mikrosatelity są rozłożone równomiernie co 6–10 kpz, również w obszarach zajmowanych przez geny. Pięć grup powtórzeń mono-, di-, tri- i pentanukleotydowych (A > AC > AAAN > AAN > AG, gdzie N oznacza C, G, T) występuje najczęściej i stanowi 76% znanych sekwencji mikrosatelitarnych. W genach najczęściej umiejscowione są w sekwencjach flankujących i intronach, chociaż są spotykane również w sekwencjach kodujących. Badania populacyjne wykazują, że sekwencje mikrosatelitarne charakteryzują się małą częstością mutacji i to zarówno w komórkach rozrodczych, jak i somatycznych.

Najmniej można obecnie powiedzieć o tej części genomu, którą określono jako „inną", mimo że, jak się wydaje, to właśnie tu zakodowana jest większość informacji regulacyjnych, decydujących o rozwoju i funkcjonowaniu organizmu.

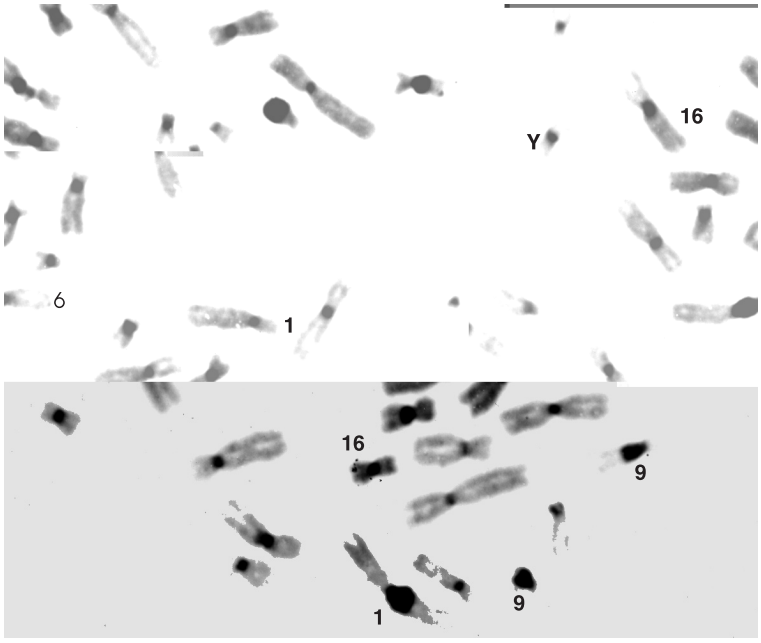
II.2.3. Kariotyp

Prawidłowa komórka somatyczna człowieka jest diploidalna i zawiera 23 pary chromosomów. Jeden chromosom z każdej pary pochodzi od matki, drugi od ojca. Zestaw chromosomów komórki został podzielony na 7 łatwych do odróżnienia grup, oznaczonych początkowymi literami alfabetu od A do G. W każdej grupie chromosomy mają podobną wielkość i kształt oraz są uszeregowane według malejącej wielkości (*ryc. II-7*). Pary chromosomów od 1 do 22 stanowią tzw. autosomy. Ostatnią, 23 parą, są chromosomy płci – XX u kobiet i XY u mężczyzn. Kariotyp jest opisywany z zastosowaniem symboli uwzględniających liczbę chromosomów, chromosomy płci oraz określenie stwierdzonej nieprawidłowości (*tab. II-6*). Zapis 46,XX oznacza prawidłowy kariotyp żeński, a 46,XY prawidłowy kariotyp męski.

Chromosomy występują we wszystkich komórkach jądrzastych, a nazwę swą zawdzięczają zdol-



Rycina II-7. Prawidłowy kariotyp męski. Obraz prążków G uzyskany po trawieniu chromosomów trypsyną i barwieniu odczynnikiem Giemsy



Rycina II-8. Specyficzne barwienie regionów centromerowych chromosomów – prążki C. Chromosomy 1, 9, i 16 mają ciemno wybarwione regiony heterochromatyny konstytucyjnej, a chromosom Y heterochromatynę dystalnej części długiego ramienia

ności do wybarwiania (gr. *chromos* – kolorowy, *soma* – ciało). Każdy gatunek roślin i zwierząt ma charakterystyczny dla siebie zestaw chromosomów nazywany kariotypem. Określenie to jest stosowane także w odniesieniu do zestawu chromosomów typowego dla danego osobnika. Podstawowe zasady klasyfikacji i identyfikacji chromosomów oraz formy przedstawiania kariotypu zostały opracowane podczas trzech konferencji: w Denver (1960), Londynie (1963) i Paryżu (1971). Zestaw chromosomów pojedynczej komórki przedstawiony zgodnie z tymi zasadami nazywa się kariogramem.

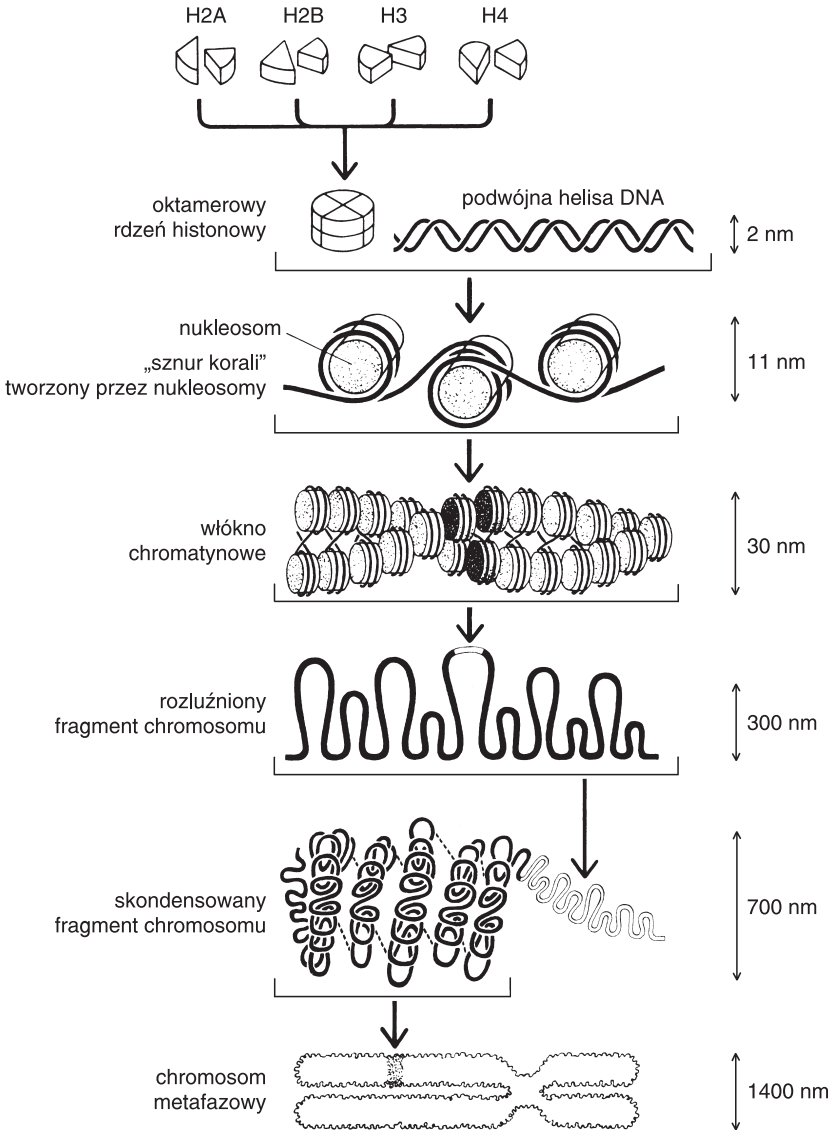
Około 30% populacji wykazuje niewielkie dziedziczne różnice w budowie chromosomów (tzw. warianty morfologiczne). Tego rodzaju zmienność osobnicza, określana jako heteromorfizm chromosomów, stanowi przykład polimorfizmu genetycznego. Dotyczy on najczęściej regionów nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny długiego ramienia chromosomu Y, przycentromerowych regionów chromosomów 1, 9 i 16 pary oraz wszystkich chromosomów akrocentrycznych (*ryc. II-8*). Heteromorfizm jest charakterystyczny także dla regionów organizatorów jąderka i satelitów występujących w chromosomach akrocentrycznych.

II.2.3.1. Struktura chromosomu

Chromosom jest zbudowany z DNA i białek, z których największą masę stanowią histony. Histony odznaczają się zwiększoną, w porównaniu z innymi białkami, liczbą aminokwasów zasadowych, takich jak lizyna i arginina, co ułatwia im wiązanie się z DNA. Spośród pięciu typów histonów cztery mają wysoce konserwatywną budowę. Oznacza to, że skład aminokwasowy tych białek jest zachowywany w procesie ewolucji, ze względu na pełnione przez nie funkcje.

Kompleks kwasy nukleinowe–białka jest nazywany chromatyną. Jest ona widoczna w jądrze interfazowym jako substancja wykazująca zróżnicowany stopień zagęszczenia – kondensacji. Chromatyna o dużym stopniu kondensacji jest określana jako heterochromatyna w odróżnieniu od mniej skondensowanej euchromatyny.

Chromosomy jako indywidualne struktury są widoczne tylko podczas podziału komórkowego. Stanowią one specyficzną formę wielostopniowej organizacji przestrzennej chromatyny (*ryc. II-9*). Podstawową jednostką ich struktury jest nukleosom, na który składają się białka histonowe mocno związane z opasującą je 2 i ½ razy podwójną helisą DNA. DNA nukleosomu zawiera zawsze tę samą liczbę par nukleotydów. W dalszym etapie organizacji chromatyny nukleosomy łączą się ze sobą w strukturę przypominającą sznur korali. W wyniku pofałdowania i skręcenia struktury nukleosomowej tworzy się następnie włókno chromatynowe, które zwija się w postać tzw. selenoidu. Kolejne poziomy organizacji są poznane dużo słabiej. Przyjmuje się, że chromosom metafazowy,

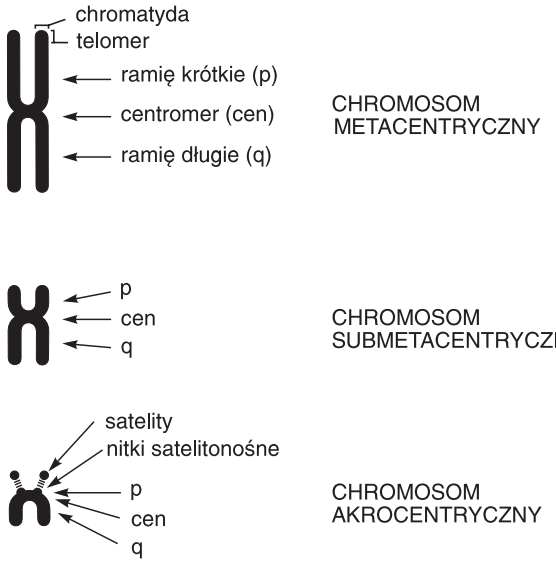


Rycina II-9. Struktura chromatyny. Kolejne etapy upakowania podwójnej helisy DNA. H2A, H2B, H3 i H4 to oznaczenia dla poszczególnych typów histonów o budowie konserwatywnej

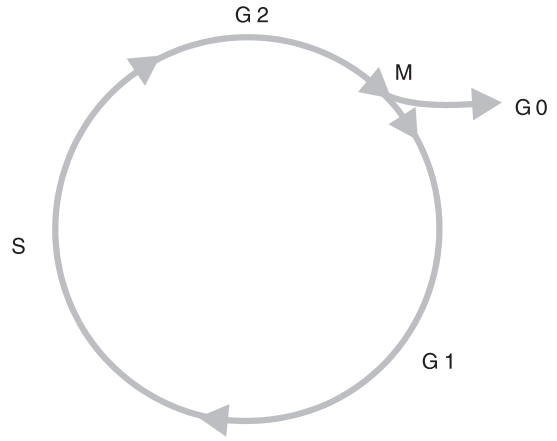
najbardziej skondensowana postać chromatyny, powstaje w wyniku tworzenia się kolejnych skrętów i pętli selenoidu. Chromosom metafazowy wykazuje 10 000 razy większą kondensację DNA niż chromatyna jądra interfazowego.

Chromosomy metafazowe są zbudowane z dwóch identycznych (siostrzanych) chromatyd. Miejsce połączenia chromatyd – centromer (tzw. przewężenie pierwotne) dzieli chromosom na dwa ramiona, krótkie i długie. Regiony na końcach obu ramion są nazywane telomerami (gr. telos – koniec). Położenie centromeru decyduje o kształcie chromosomów, różnicując je na chromosomy meta-, submeta- i akrocentryczne (*ryc. II-10*). Długość ramion w chromosomach submeta- i akrocentrycznych jest wyraźnie zróżnicowana, w chromosomach metacentrycznych natomiast w przybliżeniu taka sama. Cechą wyróżniającą chromosomy akrocentryczne jest obecność na końcu ramion krótkich grudek chromatyny, zwanych w terminologii cytogenetycznej satelitami. Charakterystyczna jest wielkość i liczba satelitów, a także długość nitki satelitonośnej.

Centromer jest niezbędnym elementem struktury chromosomu zapewniającym właściwą segregację chromosomów w czasie mejotycznego i mitotycznego podziału komórki. W kilkumilionowej sekwencji nukleotydów składającej się na centromer znaleziono jedynie różnego typu sekwencje powtórzone. W większości są to sekwencje satelitarne, ale wyróżniono też wiele sekwencji typu SINE czy LINE. Wśród pięciu typów sekwencji sa-



Rycina II-10. Budowa chromosomu metafazowego



Rycina II-11. Schemat cyklu komórkowego. G1 – faza spoczynkowa, trwają przygotowania do syntezy DNA, S – faza replikacji DNA, G2 – faza spoczynkowa, trwają przygotowania do organizacji materiału genetycznego, M – faza podziałowa

telitarnych, różniących się długością powtarzanej sekwencji, w centromerach wszystkich chromosomów występuje sekwencja α. Długość powtarzającego się motywu wynosi 171 nukleotydów. W większości badanych centromerów jest obecny również satelita 5-nukleotydowy $(GGAAT)_n$. Pozostałe sekwencje satelitarne są charakterystyczne dla określonych chromosomów. Bloki sekwencji satelitów α i 5-nukleotydowe stanowią podstawę struktury i organizacji centromeru. Budowę centromeru dopełniają specyficzne białka wiążące się między innymi z satelitą α. Wiele tych białek ma strukturę podobną do histonów.

Telomery uniemożliwiają zlepianie się chromosomów i zapewniają im właściwe umiejscowienie wewnątrz jądra komórkowego. Nie zawierają sekwencji kodujących. Zbudowane są z wielokrotnych powtórzeń sekwencji bogatych w GT. U człowieka jest to sekwencja 5'-TTAGGG-3'. W momencie urodzenia długość poszczególnych telomerów wynosi od 6 do 10 tysięcy nukleotydów. Jak się wydaje, najważniejszą jego funkcją jest ochrona chromosomów przed skracaniem w czasie kolejnych podziałów komórkowych. Problem ten jest szczególnie istotny dla chromosomów w komórkach rozrodczych. Nieograniczone zmniejszanie długości prowadziłoby bowiem z czasem do eliminacji genów położonych na końcach chromosomu. Uzupełnianie skracających się telomerów jest rolą telomerazy. Funkcję katalityczną tego enzymu pełnią łącznie białko i RNA. Sekwencje nukleotydów RNA służą jako matryca do syntezy podstawowej jednostki DNA telomeru. Proces skracania się telomerów nierównoważony przez aktywność telomerazy może prowadzić do śmierci komórki.

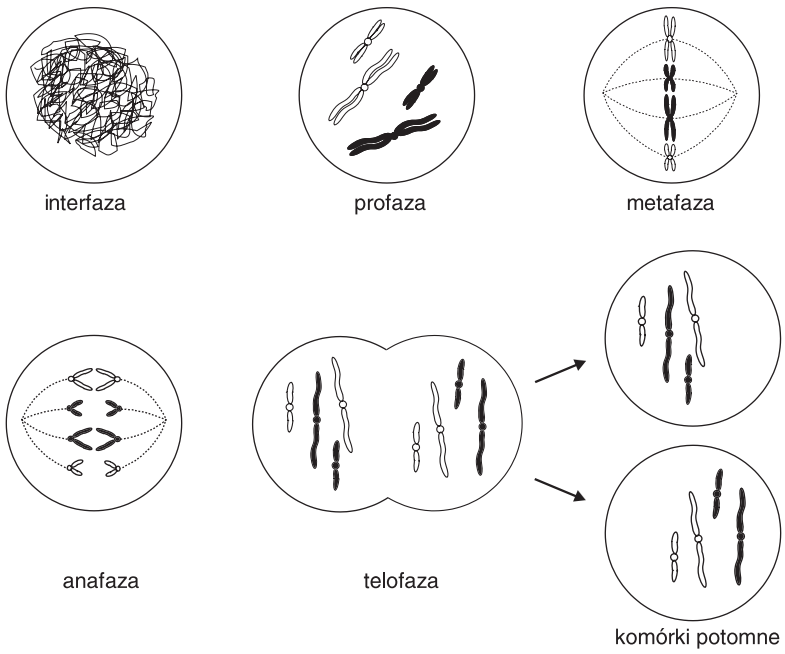
Numeracja chromosomów człowieka, od 1 do 22, odpowiada w zasadzie gradacji ich wielkości. Na przykład w chromosomie 1 jest zakodowane 8% całej informacji genetycznej (250 Mpz). W chromosomie 21 – 1,5%, a w chromosomie 22 – 1,6% tej informacji. W chromosomie X jest zawarte 5% informacji genetycznej (154 Mpz), a w chromosomie Y – 1,7% (53 Mpz) genomu.

II.2.3.2. Mitoza

Podział komórki somatycznej, w którym z jednej tworzą się dwie identyczne genetycznie komórki, jest nazywany mitozą. W czasie mitozy z chromatyd każdego chromosomu powstają chromosomy potomne, dzięki czemu komórki potomne zachowują taką samą liczbę chromosomów jak komórka macierzysta.

Komórki eukariotyczne dzielą się cyklicznie (*ryc. II-11*). Każdy podział komórki poprzedza synteza DNA, podczas której następuje podwojenie jego ilości w komórce (faza S syntezy DNA trwająca ok. 8 godz.). Okres, w którym cały genom zostaje podwojony, trwa około 4 godzin i jest nazywany fazą G2 (ang. gap). Faza podziału mitotycznego (M) trwa niespełna 1 godzinę, po czym następuje interfaza (G1) wykazująca bardzo zróżnicowaną długość trwania. Komórki, które nie będą się już dzielić, pozostają w fazie G0.

W przebiegu mitozy można wyróżnić cztery fazy (*ryc. II-12*). W pierwszej (profaza) w jądrze następuje stopniowa spiralizacja i kondensacja



Rycina II-12. Schemat podziału mitotycznego komórki (na przykładzie dwóch par chromosomów). Chromosomy od jednego z rodziców zaznaczono na czarno, od drugiego są jasne

chromatyny, chromosomy stają się widoczne. Każdy z nich jest przyczepiony do określonego miejsca błony jądrowej i składa się z przylegających do siebie chromatyd siostrzanych połączonych w centromerze. Zanika błona jądrowa. W drugiej (metafaza) chromosomy osiągają największy stopień kondensacji, wędrują do płaszczyzny równikowej komórki i formują płytkę metafazową. Powstaje wrzeciono mitotyczne. W tym stadium najłatwiejsza jest analiza liczby i struktury chromosomów, co wykorzystuje się w badaniach cytogenetycznych. W późnej metafazie następuje podział centromerów i oddzielenie od siebie chromatyd siostrzanych chromosomów. W następnej fazie (anafaza) chromatydy wędrują do przeciwległych biegunów komórki, stając się chromosomami potomnymi. W końcowym etapie podziału (telofaza) zostaje odtworzona błona jądrowa. Następuje podział cytoplazmy i powstają dwie komórki potomne zawierające po 46 chromosomów (każdy z nich składa się z jednej chromatydy). W nowo powstałych komórkach zachodzą procesy odwrotne do obserwowanych w czasie profazy. Chromosomy ulegają dekondensacji do interfazowej postaci chromatyny.

II.2.3.3. Mejoza

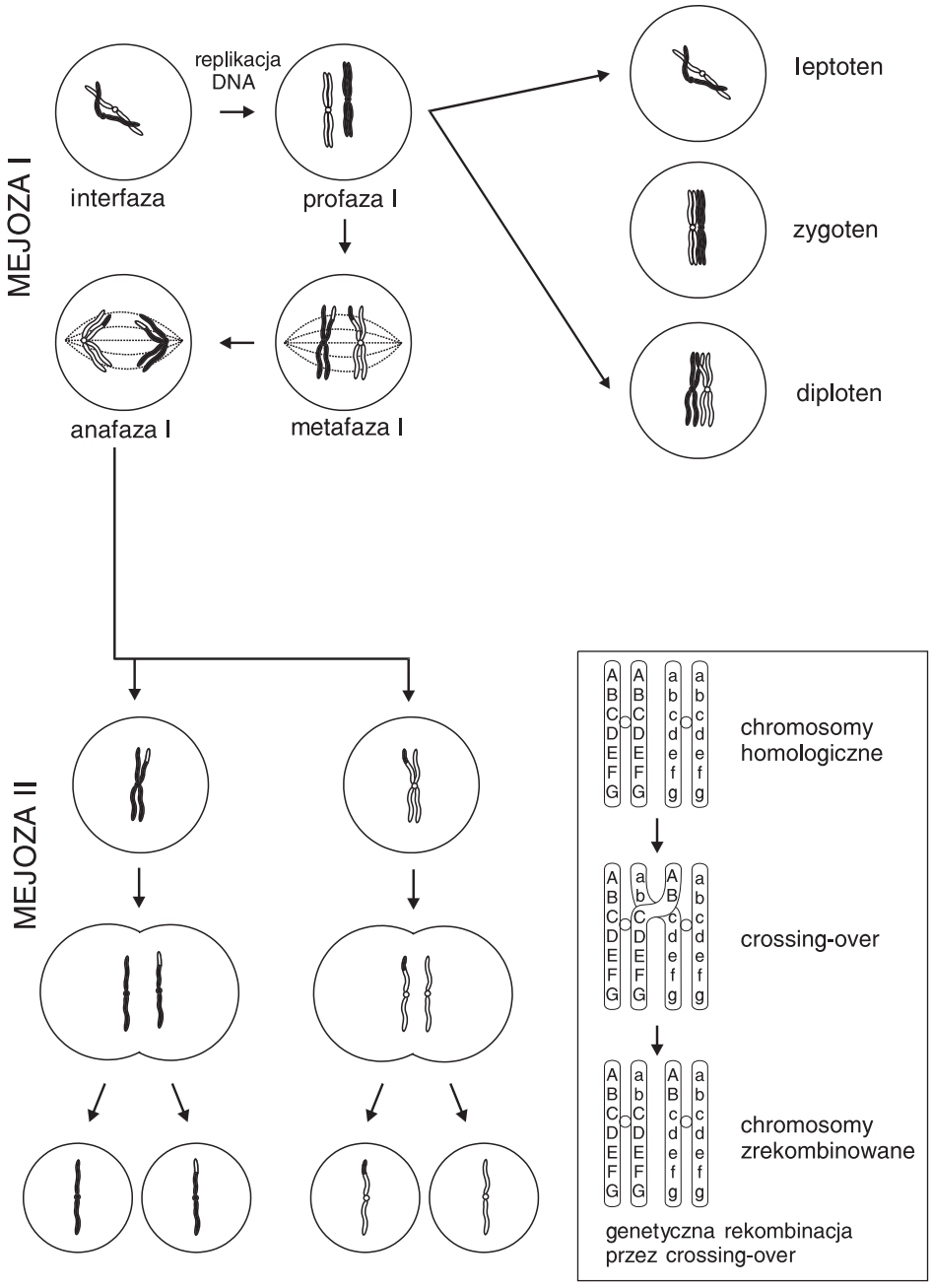
Jako mejoza określane są dwa sprzężone ze sobą podziały komórkowe (mejoza I i mejoza II), w których wyniku powstają komórki płciowe – gamety (*ryc. II-13*). Różnią ją od mitozy dwa zjawiska o podstawowym znaczeniu biologicznym: redukcja liczby chromosomów i rekombinacja genetyczna.

W czasie mejozy diploidalna liczba chromosomów, typowa dla komórek somatycznych (2n = 46), zostaje zredukowana do haploidalnej (n = 23). Zapewnia to zachowanie stałej, charakterystycznej dla gatunku liczby chromosomów, która zostaje odtworzona po połączeniu gamety męskiej i żeńskiej w zygotę. Każda komórka organizmu rozwijającego się z zygoty ma więc dwa zestawy chromosomów, jeden pochodzący od matki, drugi od ojca. Odpowiadające sobie chromosomy tworzą pary. Chromosomy jednej pary są nazywane homologicznymi.

Rekombinacja stanowiąca wynik wymiany fragmentów chromosomów homologicznych zapewnia genetyczną zmienność i niepowtarzalność genotypu gamet, a zatem i rozwijającego się z zygoty nowego organizmu. Oba te zjawiska, redukcja liczby chromosomów i rekombinacja, zachodzą w I podziale mejotycznym. Pierwsze z nich realizuje się dzięki temu, że dwu podziałom komórkowym towarzyszy tylko jedna runda replikacji DNA, poprzedzająca mejozę I. Drugie zachodzi w czasie profazy tego podziału.

Mejoza I

Rozpoczyna się od długo trwającej profazy, w której wyróżnia się kilka następujących po sobie stadiów. Chromosomy homologiczne, widoczne



Rycina II-13. Schemat podziału mejotycznego komórki (na przykładzie dwóch par chromosomów). Chromosomy od jednego z rodziców zaznaczono na czarno, od drugiego są jasne

początkowo jako długie, cienkie nici (leptoten), przylegają do siebie, tworząc biwalenty (zygoten), po czym ulegają kondensacji (pachyten). W tym czasie w każdym z chromosomów można wyróżnić dwie chromatydy (biwalent składa się więc z 4 chromatyd). Następuje wymiana fragmentów chromatyd chromosomów homologicznych, tzw. crossing-over. Warunkiem tej wymiany jest powstanie połączeń chromatyd (chiazm) widocznych w czasie rozdzielania się biwalentów (diploten). Stopniowemu rozdzielaniu się biwalentów towarzyszy terminalizacja chiazm (w diakinezie pozostają one jedynie na końcach chromosomów). Chromosomy, w których nastąpił crossing-over, nazywane są zrekombinowanymi. Zawierają one mieszaninę materiału genetycznego zawartego pierwotnie w chromosomach homologicznych, a więc mieszaninę informacji genetycznej matki i ojca.

W dalszym przebiegu mejozy I chromosomy homologiczne gromadzą się w płaszczyźnie równi-

kowej komórki (metafaza I), a następnie wędrują do jej przeciwległych biegunów (anafaza I). Powstają dwie komórki potomne zawierające po 23 chromosomy (po jednym chromosomie homologicznym z każdej pary).

Mejoza II
Następuje bezpośrednio po zakończeniu pierwszej. Nie poprzedza jej interfaza ani synteza DNA. Mechanizm i przebieg tego podziału jest taki sam, jak podziału mitotycznego. Powstają komórki potomne identyczne pod względem liczby chromosomów i zawartej w nich informacji genetycznej.

U mężczyzn gamety są wytwarzane w procesie spermatogenezy, a u kobiet oogenezy. W podziale mejotycznym z diploidalnego spermatogonium powstają 4 spermatozoa. W gonadach żeńskich natomiast, w wyniku nierównego podziału cytoplazmy w obu podziałach mejotycznych, powstaje jeden oocyt i jedno ciałko kierunkowe, które następnie ulega degradacji. Tak więc ostatecznym wynikiem mejozy jest powstanie tylko jednej gamety żeńskiej – dojrzałego oocytu.

II.3. Zmienność i dziedziczność

Obserwowana na co dzień zmienność i różnorodność świata żywego ma podłoże zarówno dziedziczne, jak i uwarunkowane czynnikami środowiskowymi. W zależności od warunków zewnętrznych organizmy o identycznym genotypie mogą niekiedy znacznie się różnić między sobą fenotypowo. Zmiany w środowisku mogą bowiem warunkować sytuacje, w których cecha dziedziczona z pokolenia na pokolenie nie ujawnia się. Na zmienność fenotypową składa się również wiele cech, które organizmy (rośliny, zwierzęta czy ludzie) nabywają w trakcie życia osobniczego. Nie są to jednak cechy przekazywane potomstwu. Podstawą zmienności są mechanizmy, które prowadzą do utrwalonych zmian w obrębie kwasów nukleinowych. W organizmach jednokomórkowych wszystkie zmiany w DNA są dziedziczne. U organizmów wielokomórkowych przekazywane z pokolenia na pokolenie są tylko zmiany następujące w DNA komórek, z których powstają gamety.

Zmienność dziedziczna jest kształtowana w procesach rekombinacji DNA i mutacji. Rekombinacja, czyli wymiana między nićmi DNA lub fragmentami chromosomów, zachodzi w procesach podziału komórek i prowadzi do powstania różnych kombinacji genów oraz ich alleli. Ma to szczególne znaczenie dla genotypu gamet, a w konsekwencji dla ujawniania się określonych cech fenotypowych u osobników potomnych. Gamety danego osobnika, mimo posiadania pełnej informacji genetycznej, nie są bowiem genetycznie identyczne.

II.3.1. Mutacje

Za tworzenie się nowych alleli danego genu, czy też nowych genów, są odpowiedzialne mutacje. To właśnie zmienność mutacyjna jest podstawą procesów ewolucyjnych. Nie wszystkie jednak mutacje są dziedziczne. Mutacje komórek somatycznych, a także mutacje letalne nie są dziedziczone z pokolenia na pokolenie. Mutacje mogą dotyczyć sekwencji nukleotydów w cząsteczce DNA oraz struktury i liczby chromosomów. Powstają spontanicznie lub też na skutek działania czynników mutagennych, takich jak promieniowanie jonizujące czy niektóre związki chemiczne. Mutacjom może podlegać każdy nukleotyd w cząsteczce kwasu nukleinowego. Znane są jednak obszary chromosomu, w których częstość mutacji jest dużo większa niż w innych odcinkach.

Mutacją punktową jest zamiana jednego nukleotydu na inny. Może nią być również ubytek lub wstawienie pojedynczego nukleotydu. Wśród mutacji punktowych wyróżnia się mutacje w części kodującej, zmieniające bezpośrednio sens informacji genetycznej, oraz mutacje w obszarach regulacyjnych genu czy np. w intronach. W takich przypadkach można się spodziewać zmian w ekspresji genu lub błędnego składania RNA.

Gdy mutacja punktowa następuje w sekwencji kodującej genu, skutkiem jej może być zamiana nukleotydu i utworzenie trójki nukleotydów kodującej inny aminokwas (ang. missens). Może też powstać mutacja nonsens, gdy w wyniku zamiany nukleotydów zostaje utworzony jeden z kodonów stop. W przypadku delecji lub wstawienia nukleotydu powstaje mutacja zmiany ramki odczytu (ang. frameshift) w sekwencji kodującej informację genetyczną. Skutkiem mutacji punktowej może być zmiana lub utrata funkcji kodowanego białka. Obserwowany w przypadku powstania mutacji nonsens, a bardzo często i „frameshift" częściowy lub całkowity brak kodowanego białka jest wynikiem przedwczesnej terminacji translacji. Mutacje punktowe mogą również prowadzić do utraty przyłączania białek opiekuńczych do danej sekwencji nukleotydów, a w rezultacie braku właściwego fałdowania się polipeptydu.

W postaci klasycznej terminem mutacja polimorficzna (por. podrozdz. II.3.3) określa się natomiast te punktowe zmiany w genie, które nie prowadzą do zmiany aminokwasu w cząsteczce kodowanego białka. Sytuacje takie występują wtedy, gdy dany aminokwas jest wyznaczany przez kilka różnych kodonów – tzw. degeneracja kodu genetycznego.

Obok mutacji punktowych wyróżnia się też delecje, wstawianie czy inwersję większych fragmentów genu. Mutacją genową jest więc też delecja całego genu *DMD* (2,3 Mpz), kodującego dystrofinę. Gen ten stanowi 1,5% chromosomu X, a delecja tego genu jest dobrze widoczna w badaniu cytogenetycznym i mogłaby być klasyfikowana jako aberracja chromosomowa.

Mutacja nie musi się ujawniać w momencie powstania. Efekty działania mutacji uwidaczniają się dopiero wtedy, gdy zaistnieją warunki fenotypowej ekspresji zmutowanego genu. Przykładem relacji mutacja i środowisko mogą być mutacje klasyfikowane niekiedy jako tzw. zmiany ekogenetyczne. Dziedzicznie uwarunkowana zdolność do wyczuwania cyjanowodoru czy fenylotiomocznika ujawnia się tylko wtedy, gdy cyjanowodór pojawi się w powietrzu lub też gdy dana osoba poliże bibułę nasyconą fenylotiomocznikiem. Osoby z akatalazją charakteryzują się brakiem katalazy. Cecha ta ujawni się jedynie wtedy, gdy krew zabarwi się na brunatno w czasie przemywania skaleczenia lub krwawiącej rany wodą utlenioną. U osób z *xeroderma pigmentosum* (defekt w genie kodującym jedną z helikaz uczestniczących w procesie naprawy DNA) zmiany skórne występują tylko wtedy, gdy osoby te są wystawione na promieniowanie słoneczne.

W literaturze można spotkać różne klasyfikacje mutacji. Jedną z nich jest bardzo przydatny podział pod względem skutków na poziomie genu. Wyróżnia się między innymi mutacje utraty funkcji (ang. loss-of-function) i mutacje uzyskania funkcji (ang. gain-of-function).

II.3.1.1. Mutacje dynamiczne

Odmiennym typem mutacji są zmiany opisane po raz pierwszy w genie *FMR1*, którego defekt jest odpowiedzialny za występowanie zespołu łamliwego chromosomu X (FraX). Zmiany te polegają na zwielokrotnieniu liczby trójnukleotydowego motywu w sekwencji genu. U osób zdrowych liczba kopii trójki CGG w nieulegającej translacji części pierwszego eksonu *FMR1* nie przekracza 54. U bezobjawowych nosicieli zespołu FraX dochodzi do 200 (premutacja). U osób chorych liczba kopii może przekraczać 1000 powtórzeń. Ten typ zmian nazwano mutacją dynamiczną. Cechą charakterystyczną wielu chorób powodowanych mutacjami dynamicznymi jest występowanie zjawiska antycypacji.

Mutacje dynamiczne występują w części kodującej lub niekodującej odpowiedniego genu. Klasyfikacja zależy od roli, jaką mutacje te odgrywają w patogenezie poszczególnych chorób. Pierwszą grupę stanowiłyby choroby takie jak zespół FraX i ataksja Friedreicha, w których brak białka lub jego bardzo małe stężenie spowodowane jest zaburzeniem prawidłowego przebiegu transkrypcji. W zespole FraX jest to na przykład spowodowane hipermetylacją powtórzeń CGG na końcu 5'. Do drugiej grupy zalicza się choroby, w których produkt białkowy jest obecny, ale został zmieniony w wyniku obecności ciągów glutamin (efekt wielokrotnych powtórzeń motywu CAG w sekwencji genu). Takie białko z reguły nabywa nową, szkodliwą dla organizmu funkcję, a mutacja jest dominująca. Brak charakterystycznego dominującego dziedziczenia w przypadku rdzeniowo-opuszkowego zaniku mięśni (defekt genu *AR* zlokalizowanego na chromosomie X), jest prawdopodobnie wynikiem zjawiska losowej inaktywacji chromosomu X. Trzecią grupę stanowią choroby powodowane powieleniem trójnukleotydowego motywu w niekodujących fragmentach genu, w których efekt dominacji wywołany jest nabyciem nowej funkcji przez RNA. Ta nowa funkcja jest wynikiem pojawienia się w cząsteczce RNA powielonych trójnukleotydowych motywów. „Toksyczny" RNA, np. w przypadku dystrofii miotonicznej typu 1, poprzez sekwestrację[2] białek wiążących ciągi $(CUG)_n$ w mRNA zaburza prawidłowy przebieg procesu składania różnych transkryptów, co powoduje plejotropowość zmian fenotypowych charakterystycznych dla tej choroby. Podobny patomechanizm sugeruje się dla zespołu drżenia/ataksji związanej z łamliwym X (FXTAS). Do trzeciej grupy zalicza się też ataksje rdzeniowo-móżdżkowe typu 8, 10, 12, a także chorobę podobną do choroby Huntingtona.

Do końca 2010 roku opisano jeszcze kilkadziesiąt innych chorób genetycznych spowodowanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych (*tab. II-7*). Opisano także takie choroby, jak dystrofia miotoniczna typu 2, gdzie wykazano zwielokrotnienie motywu czteronukleotydowego (CCTG), oraz ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typu 10 z powielonym wielokrotnie motywem pięcionukleotydowym (ATTCT).

[2] Sekwestracja – tu włączanie białek w strukturę agregatów tworzonych przez nieprawidłowo zwinięte białko.

Tabela II-7. Choroby dziedziczne warunkowane mutacjami dynamicznymi w obszarach powtórzeń sekwencji trójnukleotydowych (podział ze względu na lokalizację mutacji)

Choroba	Gen	*Locus*	Rodzaj powtórzeń	Antycypacja[1]	Dziedziczenie[2]	Lokalizacja w genie[3]	Patomechanizm[4]	Typ choroby[5]
Mutacje w części kodującej genów								
Choroba Huntingtona (HD)	*IT15*	4p16.3	CAG	O	AD	ORF	ZF/UF	ND
Choroba podobna do HD typ 2 (HDL-2)	*JPH3*	16q24.3	CAG/CTG	?			ZF	
Ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typ 1 (SCA1)	*ATXN1*	6p23	CAG	O				
Ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typ 2 (SCA2)	*ATXN2*	12q24						
Ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typ 3 (SCA3) [Choroba Machado-Josepha (MJD)]	*ATXN3*	14q24.3-q31						
Ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typ 6 (SCA6)	*ACNA1A*	19p13		n.o.				
Ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typ 7 (SCA7)	*ATXN7*	3p21.1-p12		O				
Ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typ 17 (SCA17)	*TBP*	6q27	CAG/CAA	O/M*				
Zanik jąder zębatych, czerwiennych, gałek bladych i ciał podwzgórzowych Luysa (DRPLA)	*DRPLA*	12p13.31	CAG	O				
Rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni związany z chromosomem X (SMAX1)	*AR*	Xq13-21		n.o.	XR			
Mutacje w części niekodującej genów								
Zespół łamliwego chromosomu X (FXS, FraX) Zespół drżenia/ataksji związany z łamliwym chromosomem X (FXTAS)	*FMR1*	Xq27.3	CGG	M –	XD	5' UTR	UF RNA ZF	ZW
Upośledzenie umysłowe związane z FRAXE (FXE MR)	*FMR2*	Xq28	GCC	n.o.	XD (?)		UF	
Ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typ 8 (SCA8)[6]	*TXN8/ATXN8OS*	13q21	CTG/CAG	M	AD	3' UTR/ORF	n.z.	ND
Dystrofia miotoniczna typ 1 (DM 1)	*DMPK*	19q13	CTG			3' UTR	RNA ZF	ZW
Ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typ 12 (SCA12)	*PP2R2B*	5q31-q33	CAG	?		5' UTR	n.z.	ND
Ataksja Friedreicha typ 1 (FRDA)	*FRDA*	9q13-21.1	GAA	M	AR	intron	UF	ZW

Wg D. Hoffman-Zacharskiej, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, porównaj także: www.neuro.wustl.edu/neuromuscular

n.o. – nie określono

n.z. – mechanizm nieznany

[1] Antycypacja zazwyczaj w dziedziczeniu: O – odojcowskim; M – odmatczynym; * – zależna od konfiguracji powtórzeń CAG/CAA.

[2] Dziedziczenie: XD – dominujące sprzężone z płcią; XR – recesywne sprzężone z płcią, AD – autosomalne dominujące;

[3] ORF – otwarta ramka odczytu; UTR – region nieulegający translacji (ang. untranslated region);

[4] ZF – zmiana/zaburzenie funkcji białka; UF – utrata funkcji białka; RNA ZF – zaburzenie oddziaływań RNA;

[5] ND – choroba zwyrodnieniowa ośrodkowego układu nerwowego, ZW – zespół wieloukładowy;

[6] Mutacja warunkująca SCA8 dotyczy dwóch zachodzących na siebie genów ulegających ekspresji w odwrotnej orientacji *ATXN8OS* (CTG w regionie 3'UTR) i *ATXN8* (CAG w ORF).

II.3.2. Aberracje chromosomowe

Pojęcie aberracja chromosomowa odnosi się do wszelkich nieprawidłowości chromosomów. Zgodnie z klasyczną definicją określa ono mutację tak dużą, że staje się ona widoczna w mikroskopie świetlnym. Wielkość najmniejszej widocznej w mikroskopie mutacji, np. delecji, oceniana jest na $2–4 \times 10^6$ par zasad. Aberracje chromosomowe powstają w komórkach somatycznych lub w gametach. Mogą powstawać *de novo* lub być dziedziczone od rodziców. Wyróżnia się aberracje liczbowe i strukturalne.

Aberracje liczbowe

Wśród nieprawidłowości liczbowych chromosomów wyróżnia się poliploidię i aneuploidię. Komórki, w których liczba chromosomów stanowi wielokrotność liczby haploidalnej większą niż 2n (u człowieka np. 3n = 69,XXY lub 4n = 92,XXYY), nazywane są poliploidalnymi. Zestaw chromosomów, w którym ich liczba nie stanowi prostej wielokrotności liczby haploidalnej, np. 47,XXX, określany jest jako aneuploidalny.

Poliploidia – u człowieka jest zazwyczaj cechą letalną. Najczęściej występującą postacią poliploidii jest triploidia oraz tetraploidia. Triploidia powstaje zazwyczaj w wyniku zapłodnienia oocytu przez dwa plemniki lub przez połączenie dwóch gamet, z których jedna jest nieprawidłowa, diploidalna. Tetraploidia jest skutkiem braku pierwszego podziału zygoty, powodującego podwojenie liczby chromosomów bezpośrednio po zapłodnieniu.

Aneuploidia – należy do najczęściej występujących aberracji chromosomowych (1/250 noworodków) (*tab. II-8*). Najczęstszą jej postacią jest trisomia (obecność dodatkowego chromosomu, tzn. trzech zamiast dwóch kopii danego chromosomu). Wśród stwierdzanych trisomii 50% stanowią trisomie autosomów (21, 13, 18), drugą połowę zaś trisomie chromosomów płci (XXY, XXX i XYY). Brak jednego chromosomu w diploidalnym zestawie, określany jako monosomia, jest zazwyczaj cechą letalną. Wyjątek stanowi obecność jednego chromosomu X (45,X) odpowiedzialna za występowanie zespołu Turnera.

Aneuploidia powstaje w wyniku nieprawidłowego rozdzielenia się chromosomów homologicznych (jednej pary) lub chromatyd siostrzanych chromosomu w czasie podziału komórkowego. Najczęściej jest to nierozdzielenie się (nondysjunkcja) chromosomów (*ryc. II-14*). Nondysjunkcja może nastąpić podczas mejozy (w momencie powstawania gamet) lub w trakcie podziałów mitotycznych zygoty. Nondysjunkcja występuje częściej w oogenezie niż w spermatogenezie.

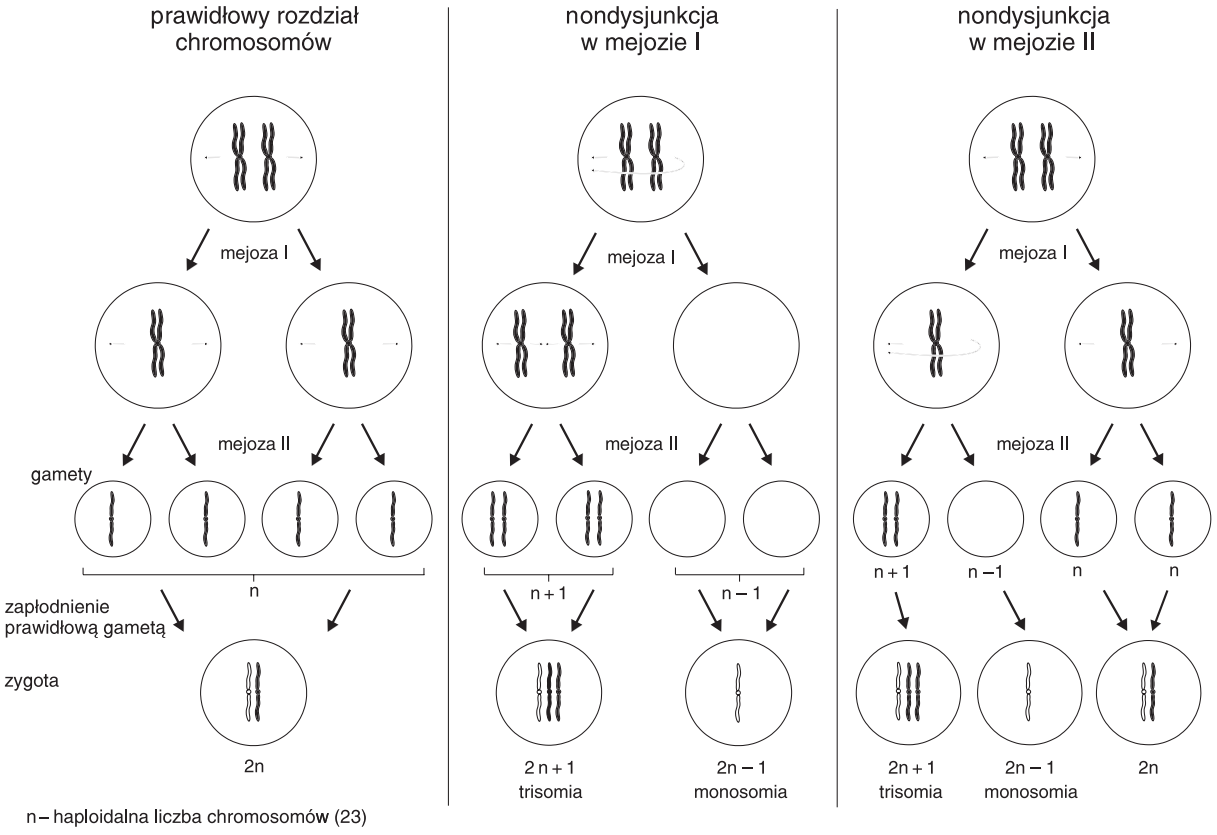
W wyniku nondysjunkcji mejotycznej powstają gamety disomiczne lub nullisomiczne w odniesieniu do specyficznego chromosomu. Połączenie z gametą prawidłową prowadzi do powstania zygoty trisomicznej lub monosomicznej. Wszystkie komórki rozwijającego się organizmu mają wówczas tę samą nieprawidłową liczbę chromosomów.

Nondysjunkcja mitotyczna prowadzi do powstania mozaikowości chromosomowej. Oznacza to wystąpienie w organizmie rozwijającym się z zygoty dwóch lub więcej subpopulacji komórkowych różniących się zestawem chromosomów (np. mozaikowość 45,X/47,XXX).

Przyczyną monosomii może być również wyeliminowanie jednego chromosomu z komórki wskutek opóźniania jego ruchu podczas anafazy podziału mitotycznego. Przyjmuje się, że opóźnianie się chromosomu Y podczas mejozy stanowi najczęstszą przyczynę monosomii chromosomu X w zespole Turnera.

Tabela II-8. Częstość występowania chorób dziedzicznych spowodowanych aberracjami liczbowymi chromosomów

Choroba	Częstość występowania (urodzeń)
nieprawidłowości chromosomów autosomowych	
Trisomia 21 (zespół Downa)	1 na 650
Trisomia 18	1 na 5000
Trisomia 13	1 na 8000
nieprawidłowości chromosomów płci	
Zespół Klinefeltera (47,XXY)	1 na 1000 (chłopców)
Zespół XYY (47,XYY)	1 na 800 (chłopców)
Zespół Turnera (45,X lub 45,X/46,XX lub 45,X/46,XY lub izochromosom Xq)	1 na 2500 (dziewczynek)



Rycina II-14. Nondysjunkcja mejotyczna pary chromosomów i jej skutki

Aberracje strukturalne

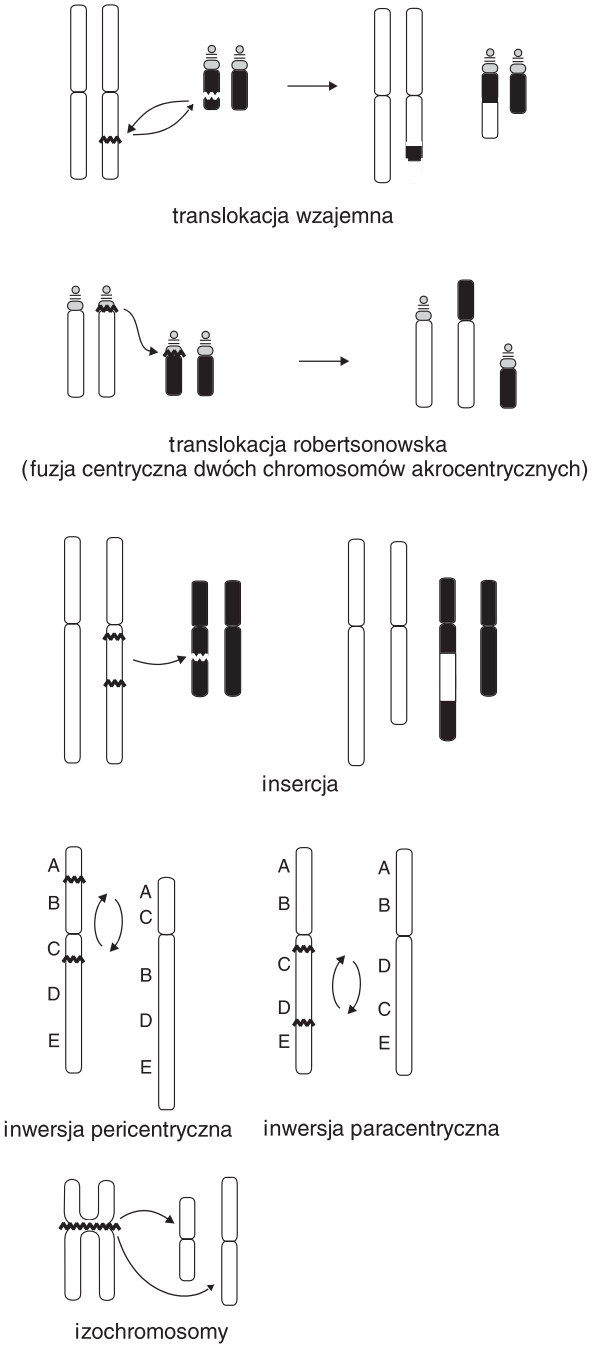
Ten typ aberracji powstaje w wyniku złamania jednego lub kilku chromosomów i nieprawidłowego połączenia się (w nową konfigurację) powstałych „lepkich" końców. Może temu towarzyszyć przegrupowanie się fragmentów chromosomów. W klasyfikacji cytologicznej tych aberracji wyróżnia się: translokacje, inwersje, izochromosomy, delecje, duplikacje, chromosomy pierścieniowe i dicentryczne (*ryc. II-15*). W odniesieniu do ich skutków fenotypowych można je podzielić na zrównoważone i niezrównoważone. Do zrównoważonych zaliczane są te aberracje, w czasie powstawania których nie doszło do utraty lub zwiększenia ilości materiału chromosomowego. Nie mają one na ogół wpływu na cechy fenotypu ich nosiciela. Są natomiast przyczyną powstawania w czasie mejozy gamet z nieprawidłowym zestawem chromosomów. Aberracje niezrównoważone cechuje zmniejszenie lub zwiększenie, w stosunku do stanu prawidłowego, ilości materiału chromosomowego. Powstają w wyniku mejotycznej segregacji aberracji zrównoważonych, ale mogą też powstać *de novo*.

Translokacje należą do najczęściej występujących aberracji strukturalnych chromosomów. Powstają w wyniku złamania chromosomów i przegrupowania (najczęściej wzajemnej wymiany) fragmentów między dwoma chromosomami. Są to tzw. translokacje wzajemne. Poza nimi wśród translokacji wyróżnia się fuzje centryczne oraz insercje.

Fuzje centryczne, określane też jako translokacje robertsonowskie, dotyczą zawsze chromosomów akrocentrycznych (13–15, 21 i 22), w których złamanie następuje w centromerze lub blisko niego. W wyniku połączenia dwóch chromosomów akrocentrycznych tworzy się jeden, często zawierający oba centromery chromosomów, z których powstał. Krótkie ramiona chromosomów uczestniczących w fuzji są najczęściej eliminowane z komórki. Translokacje tego typu są zrównoważone, ponieważ krótkie ramiona chromosomów akrocentrycznych są zbudowane z nieczynnej genetycznie heterochromatyny. Fuzje centryczne chromosomów 13 i 14 oraz 14 i 21 są najczęściej występującymi translokacjami u człowieka.

Insercje powstają w wyniku trzech złamań w dwóch chromosomach. Fragment chromosomu powstały między dwoma złamaniami w jednym chromosomie zostaje przeniesiony do drugiego chromosomu i połączony z nim w miejscu złamania.

W przypadku translokacji wzajemnej w pierwszym podziale mejotycznym, podczas łączenia się



Rycina II-15. Aberracje strukturalne chromosomów

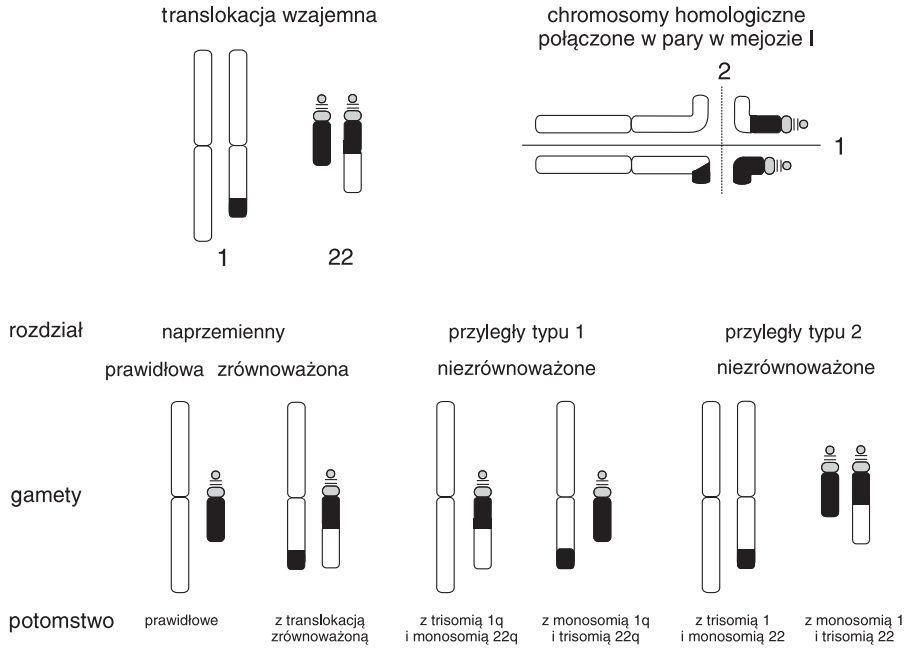
chromosomów homologicznych w pary, każdy z prawidłowych chromosomów danej pary łączy się ze swoim nieprawidłowym homologiem (produktem translokacji). Równocześnie homologiczne fragmenty obu chromosomów uczestniczących w translokacji też łączą się w parę, w wyniku czego powstaje czteroramienna konfiguracja chromosomów (*ryc. II-16*). Po rozłączeniu się tej struktury w anafazie dochodzi do rozdzielenia dwóch chromosomów do jednej i dwóch do drugiej komórki potomnej (segregacja 2:2) lub też, co zdarza się rzadziej, trzech chromosomów do jednej komórki i jednego do drugiej (segregacja 3:1).

Wyróżnia się trzy typy rozdziału chromosomów. W rezultacie rozdziału naprzemiennego jedna komórka potomna (gameta) otrzymuje zrównoważoną translokację, druga zaś prawidłowe homologi chromosomów uczestniczących w translokacji. W przypadku rozdziału przyległego typu 1 i 2 wszystkie gamety są nieprawidłowe i zawierają duplikacje oraz delecje przegrupowanych fragmentów chromosomów, a zygoty mają tzw. częściowe trisomie i monosomie (patrz *ryc. II-16*). W przypadku translokacji robertsonowskich w wyniku segregacji chromosomów mogą powstać gamety nullisomiczne i disomiczne względem danego chromosomu. Zygoty natomiast będą zawierały trisomie lub monosomie całych chromosomów (*ryc. II-17*).

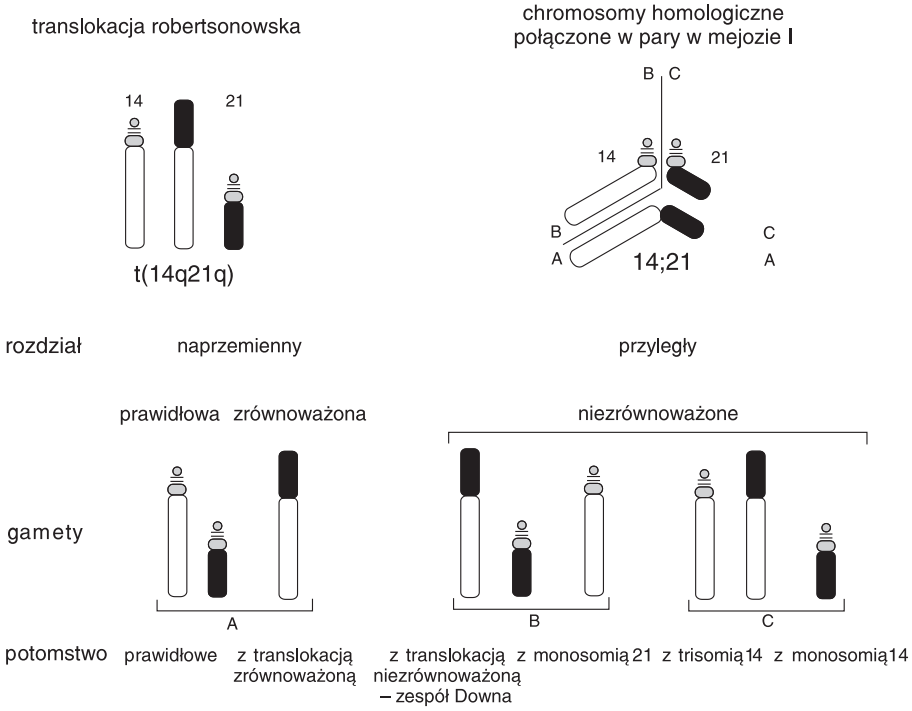
Inwersja jest to odwrócenie fragmentu chromatyny między dwoma miejscami złamań w chromosomie. Inwersja fragmentu jednego ramienia chromosomu jest określana jako paracentryczna. Gdy odwrócony fragment zawiera centromer (punkty złamań znajdują się w obu ramionach chromosomu), mówimy o inwersji pericentrycznej. Obecność inwersji zakłóca łączenie się w pary chromosomów homologicznych podczas mejozy. Odwrócony fragment chromosomu tworzy pętlę umożliwiającą kontakt między odpowiadającymi sobie (homologicznymi) regionami. W przypadku inwersji pericentrycznych crossing-over w obrębie pętli prowadzi do powstania chromosomów z duplikacjami i delecjami dystalnych (zewnętrznych) fragmentów chromosomu w stosunku do miejsc złamań. Rekombinacja w obrębie pętli utworzonej przez inwersję paracentryczną powoduje powstanie niestabilnych chromosomów dicentrycznych i acentrycznych (z dwoma centromerami lub bez centromeru) zawierających duplikacje i delecje (*ryc. II-18*).

Izochromosomy są to chromosomy składające się z dwóch identycznych (długich lub krótkich) ramion. Tworzą się w wyniku duplikacji jednego i delecji drugiego ramienia chromosomu. Mogą powstawać wskutek nieprawidłowego, poprzecznego podziału chromosomu w obrębie centromeru. U człowieka najczęściej stwierdza się izochromosom długich ramion chromosomu X występujący w zespole Turnera. Izochromosomy większości autosomów (z nielicznymi wyjątkami, jak izochromosomy krótkich ramion chromosomów 9, 12 oraz chromosomów akrocentrycznych) są letalne.

Delecja jest to utrata fragmentu chromosomu w wyniku jednego (terminalna) lub dwóch (inter-

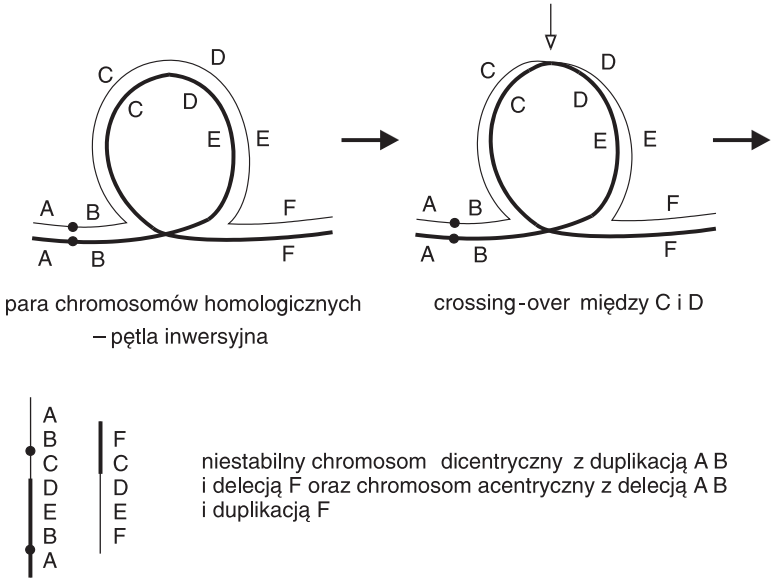


Rycina II-16. Segregacja chromosomów z translokacją wzajemną w czasie I podziału mejotycznego



Rycina II-17. Segregacja translokacji robertsonowskiej w czasie I podziału mejotycznego

stycjalna) złamań chromosomu. Jak wspomniano wcześniej, aberracje te mogą powstać w rezultacie segregacji rodzinnej inwersji lub translokacji chromosomowej. Delecje występujące w określonych regionach chromosomów odpowiedzialne za tzw. zespoły mikrodelecji mają stałą lokalizację w obrębie tych regionów. Powstają w wyniku nieprawidłowej rekombinacji DNA podczas mejozy – nieallelicznej rekombinacji homologicznej określanej też jako nierówny crossing-over. Uwarunkowana jest ona specyficzną architekturą genomu regionów zawierających tzw. LCR (ang. low copy repeats) o podobieństwie sekwencji > 95–97%. Produktem nieprawidłowej rekombinacji



Rycina II-18. Konsekwencje crossing-over w inwersji paracentrycznej. Chromosom z inwersją tworzący pętlę oznaczono grubą kreską

jest delecja i wzajemna duplikacja fragmentu genomu między dwoma sekwencjami LCR zorientowanymi w tym samym kierunku lub inwersja, gdy duplikony są ułożone w kierunku przeciwnym. Zespoły kliniczne uwarunkowane powstającymi w ten sposób rearanżacjami genomu są określane mianem chorób genomowych.

Duplikacja oznacza obecność dwóch kopii fragmentu chromosomu powstających najczęściej w wyniku translokacji, inwersji lub utworzenia izochromosomu. Duplikacje powstają także jako efekt nierównego crossing-over podczas mejozy. Występują jako powtórzenia proste (duplikacje tandemowe) lub odwrócone względem siebie (duplikacje odwrócone).

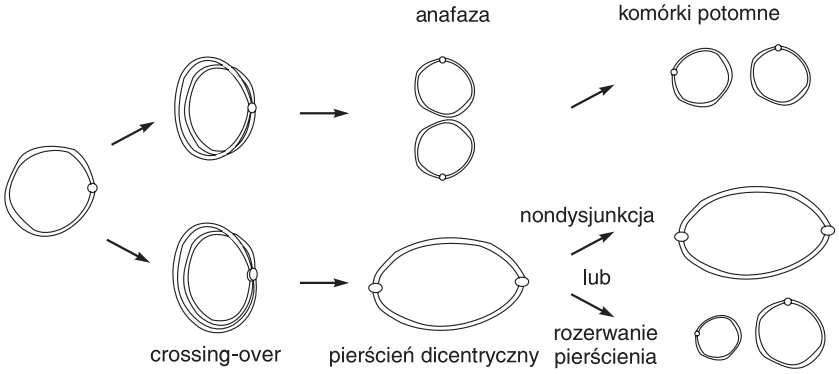
Chromosomy pierścieniowe powstają w wyniku połączenia dwóch złamanych końców jednego lub kilku chromosomów. Towarzyszy temu powstanie delecji fragmentów chromosomu dystalnych w stosunku do miejsc złamań. Chromosomy pierścieniowe są niestabilne (*ryc. II-19*). W czasie podziału mitotycznego, w wyniku wymiany między chromatydami siostrzanymi chromosomu pierścieniowego, powstaje dwukrotnie większy chromosom pierścieniowy dicentryczny. W anafazie ulega on najczęściej rozerwaniu lub wędruje w całości do jednego bieguna komórki. Następuje nierówne rozdzielenie materiału chromosomowego między komórki potomne.

Chromosomy dicentryczne zawierają dwa centromery i podobnie jak chromosomy pierścieniowe są niestabilne podczas podziału komórkowego. Powstają wskutek translokacji, inwersji, a także wymiany chromatyd siostrzanych lub chromatyd chromosomów homologicznych.

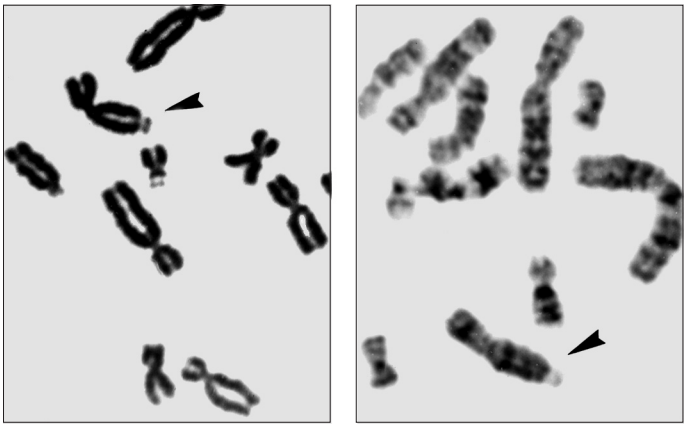
Inne aberracje

Chromosomy markerowe. Określenie to obejmuje wszystkie chromosomy, których pochodzenie i mechanizm powstania są nieznane. Chromosomy markerowe występujące konstytucyjnie są małe (przeważnie mniejsze niż chromosom 22) i występują zazwyczaj jako chromosomy dodatkowe. Mogą to być chromosomy meta- lub akrocentryczne, czasami mają strukturę pierścienia. Zawierają jeden lub dwa centromery, często wykazują obecność satelitów. Niestabilność mitotyczna chromosomów markerowych jest przyczyną stosunkowo częstego ich występowania w formie mozaikowej. Zawartość hetero- i euchromatyny decyduje o wpływie tych chromosomów na cechy fenotypu nosiciela.

Miejsca łamliwe. Są to miejsca w chromosomach, które wykazują zwiększoną częstość złamań i przerw (niebarwiących się miejsc) w warunkach częściowego zahamowania replikacji DNA. Opisano ponad 100 miejsc łamliwych, wśród których wyróżnia się, zależnie od częstości występowania w populacji, dwa podstawowe typy: pospolite (ang. common) i rzadko występujące (ang. rare). Każdą z tych grup dzieli się na klasy zależnie od warunków, które muszą być spełnione do ich cytogenetycznej ekspresji. Pełna lista miejsc łamliwych chro-



Rycina II-19. Zachowanie się chromosomu pierścieniowego podczas podziału mitotycznego komórki

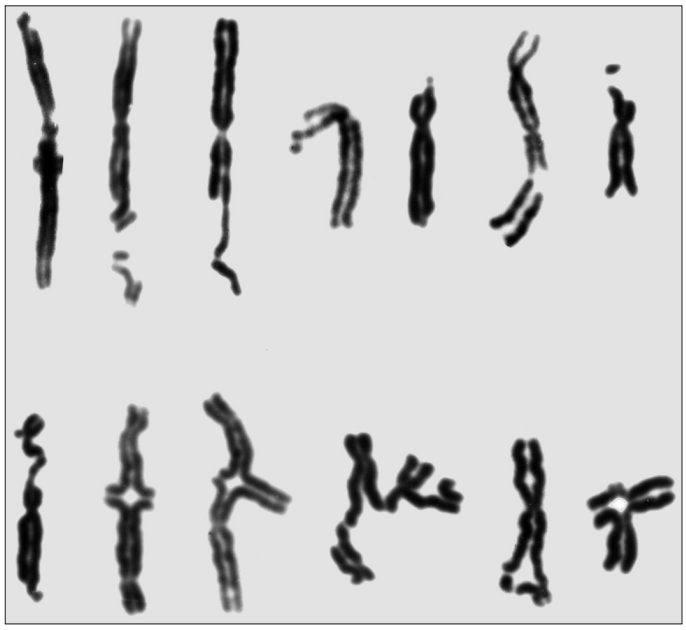


Rycina II-20. Obraz łamliwego chromosomu Xq27.3. Po lewej stronie chromosomy są wybarwione odczynnikiem Giemsy, natomiast po prawej techniką prążkowego barwienia GTG umożliwiającą identyfikację chromosomu X

mosomów człowieka znajduje się w Human Genome Database (GDB) (http://www.gdb.org/).

Wśród 31 rzadko występujących miejsc łamliwych tylko dwa zlokalizowane w chromosomie X, FRAXA w Xq27.3 i FRAXE w Xq28, mają w pełni udokumentowany związek z patologią (niepełnosprawnością intelektualną). Należą one do klasy folianowrażliwych miejsc łamliwych, tzn. takich, których warunkiem ekspresji cytogenetycznej jest niedobór kwasu foliowego i tymidyny w podłożu hodowlanym komórek (*ryc. II-20*). Podłożem molekularnym łamliwości tych miejsc jest wydłużenie niestabilnych, trójnukleotydowych sekwencji DNA w obrębie genów odpowiedzialnych za chorobę (por. mutacje dynamiczne). W większości przypadków za wystąpienie zespołu łamliwego chromosomu X jest odpowiedzialne wydłużenie niestabilnej sekwencji $(CGG)_n$ w pierwszym eksonie genu *FMR1* i metylacja pobliskiej wyspy CpG. Miejsce łamliwe FRAXA jest cytogenetycznym przejawem tego typu mutacji. Obecnie przypuszcza się także, że pospolite miejsca łamliwe, jako regiony szczególnie wrażliwe na zaburzenia replikacji DNA, uczestniczą w rozwoju procesu nowotworowego i niestabilności genomu w komórkach nowotworowych. Utrata heterozygotyczności i duże delecje w obrębie tych miejsc łamliwych [np. FRA3B (3p14.2) i FRA16D (16q23.2)] skutkują inaktywacją, mapujących się w nich, genów supresorowych (FHIT czy WWOX). Stwierdzano to w wielu typach nowotworów (płuc, nerek, przewodu pokarmowego, piersi, prostaty i innych).

Aberracje chromatydowe. Stanowią odrębną grupę aberracji, które z definicji, w odróżnieniu od aberracji typu chromosomowego, dotyczą uszkodzeń i zmian w pojedynczych chromatydach chromosomów. Powstają w czasie replikacji DNA lub po replikacji, tzn. w fazie S lub G2 cyklu komórkowego. W następnym cyklu (w komórkach potomnych) aberracje chromatydowe stają się aberracjami chromosomowymi. Wśród aberracji chromatydowych wyróżnia się miejsca niebarwiące się, tzw. przerwy chromatydowe (ang. gap) oraz złamania i wymiany chromatydowe (*ryc. II-21*). Nie wchodząc w szczegółowe omawianie rozmaitych typów wymian, ogólnie można je podzielić na takie, które



Rycina II-21. Przerwy, złamania i wymiany chromatydowe. Wymiany są widoczne jako specyficzne konfiguracje chromosomów. Aberracje chromatydowe zostały wywołane mitomycyną C w hodowli *in vitro* komórek chorego z zespołem Fanconiego

powstają między dwiema chromatydami jednego chromosomu, lub takie, które dotyczą chromatyd dwóch lub kilku chromosomów. Wymiany chromatyd między kilkoma chromosomami powodują powstanie charakterystycznych trójramiennych, czteroramiennych lub bardziej złożonych konfiguracji chromosomów. Jeśli dwa złamania prowadzące do wymiany powstaną w tym samym *locus* na obu chromatydach jednego chromosomu, są to wymiany chromatyd siostrzanych, SCE (ang. sister chromatid exchange). Mogą być one uwidocznione pod mikroskopem tylko po zastosowaniu specyficznych technik zróżnicowanego wybarwiania chromatyd siostrzanych chromosomu (*ryc. II-22*).

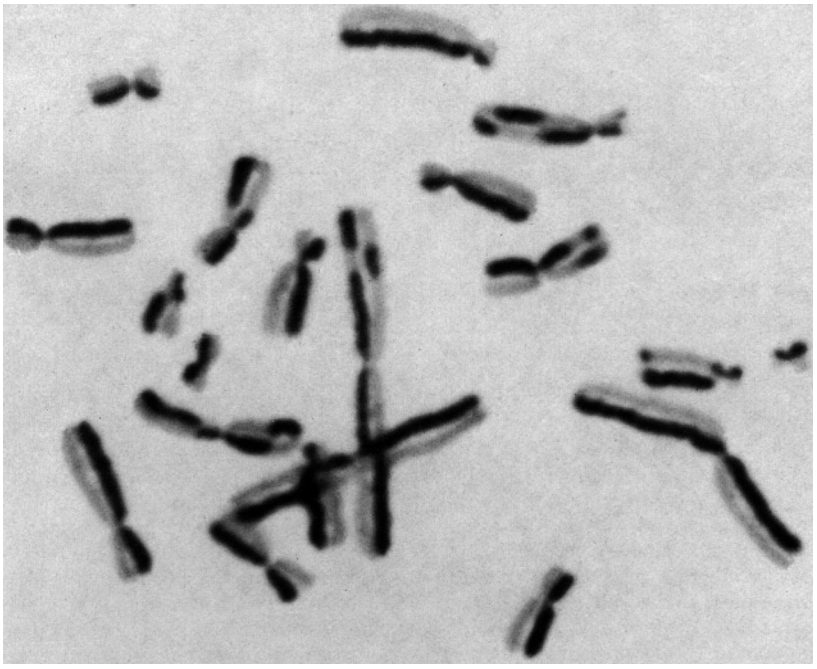
Aberracje chromatydowe, w odróżnieniu od konstytucyjnych aberracji chromosomowych, należą do aberracji nabytych. Mogą powstawać pod wpływem różnych czynników mutagennych (np. promieniowania jonizującego, mutagenów chemicznych czy infekcji wirusowych). Stanowią też przedmiot badań cytogenetycznych w diagnostyce zespołów o genetycznie uwarunkowanej niestabilności chromosomów.

II.3.3. Polimorfizm

Wzajemne występowanie wykluczających się form strukturalnych jednego lub kilku chromosomów jest określane jako polimorfizm chromosomów. Na poziomie genu zmianami polimorficznymi określa się jednoczesne występowanie w populacji różnych form allelicznych danego genotypu. W świetle dzisiejszej wiedzy zmian polimorficznych nie pomija się przy rozpatrywaniu znaczenia klinicznego. Arbitralnie przyjęło się uważać za zmianę polimorficzną taki wariant, który w populacji występuje częściej niż w 1%. Polimorfizm może dotyczyć pojedynczego nukleotydu, powtarzającego się motywu sekwencji, a także liczby kopii fragmentu DNA.

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w sekwencji DNA określa się jako SNP (ang. single-nucleotide polymorphism). SNP najprościej wykrywa się, sekwencjonując DNA. Może być identyfikowany również z wykorzystaniem technik przesiewowych, takich jak SSCP (ang. single-strand conformation polymorphism), DGGE (ang. denaturing gradient gel electrophoresis) czy HRM (ang. high resolution melt). W szczególnych przypadkach, gdy SNP zlokalizowany jest w sekwencjach rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne, enzymy te mogą zostać zastosowane w jego wykrywaniu. Taki typ polimorfizmu jest określany jako zmienność długości fragmentów restrykcyjnych, RFLP[3] (ang. restriction fragment length polymorphism). Polimorfizm sekwencji minisatelitarnych oznacza

[3] Terminem RFLP powszechnie określa się również rodzaj analizy DNA, w której są wykorzystywane enzymy restrykcyjne.



Rycina II-22. Wymiany chromatyd siostrzanych (SCE)

się skrótem VNTR (ang. variable number of tandem repeats), a sekwencji mikrosatelitarnych SSLP lub STRP (ang. single sequence length polymorphism lub short tandem repeat polymorphism).

Polimorfizmy wszystkich typów są wykorzystywane jako fizyczne markery genetyczne. W genomie człowieka najmniejszą rozdzielczością charakteryzuje się RFLP. Wynika to ze stosunkowo niewielkiej liczby miejsc rozpoznawanych w cząsteczce ludzkiego DNA przez enzymy restrykcyjne. Polimorfizm ten jest dwualleliczny. Analiza RFLP znalazła stałe miejsce w badaniach molekularnych. W określonych przypadkach umożliwia różnicowanie sekwencji prawidłowych i zmienionych na skutek mutacji.

Duża zmienność liczby powtarzających się motywów powoduje, że minisatelity i mikrosatelity są doskonałymi markerami genetycznymi. Duża liczba alleli występujących w danym *locus* predysponuje ten typ polimorfizmu do analizy sposobu dziedziczenia się badanych genów.

Największe nadzieje w praktycznym wykorzystaniu markerów polimorficznych wiąże się z analizą SNP. Powodem tego jest liczba miejsc zmiennych w całym genomie, a nie jak w przypadku mini- czy mikrosatelitów liczba alleli w danym *locus*. Najczęściej spotykany jest polimorfizm dwualleliczny, rzadko trójalleliczny, natomiast prawdopodobieństwo wystąpienia czwartego allela w danym *locus* jest bliskie zera. Szacuje się, że w genomie człowieka jest około 3 milionów markerów typu SNP, co stanowi około 90% wszystkich różnic w sekwencji. Ocenia się, że ten typ polimorfizmu DNA jest mutacyjnie stabilniejszy niż polimorfizm sekwencji satelitarnych. Średnio SNP występuje 1 na 300–1000 pz. Gęstość i nasycenie SNP nie są jednak identyczne dla całego genomu. Obszarem, gdzie obserwuje się największe zagęszczenie, jest *locus* HLA na chromosomie 6. Z drugiej strony na chromosomie X zidentyfikowano „pustynie SNP", tj. fragmenty, z których największy miał około 1,7 Mpz, gdzie nie wykryto żadnego SNP. Założeniem wykorzystania analizy SNP w badaniach jest równoczesna identyfikacja wielu tych markerów w dużych częściach lub wręcz w całym genomie, co umożliwia technologia oparta na mikromacierzach DNA. Planuje się na przykład wykorzystanie typowania SNP w prognozowaniu wystąpienia kompleksowych chorób cywilizacyjnych, takich jak astma, cukrzyca, migrena czy choroby serca. Zmiany genetyczne, w tym zmiany prowadzące do występowania chorób, zachodzą w określonym „tle genetycznym". Jak wspomniano, analiza SNP umożliwia opisanie tego „tła". Diagnostyka molekularna będzie w takich przypadkach polegać na określeniu osobistego, indywidualnego dla badanej osoby, wzoru SNP i porównaniu go ze znanym wzorem SNP charakterystycznym dla danej choroby. Szereg tego

typu informacji przynoszą badania populacyjne określane w literaturze anglosaskiej jako GWAS (ang. genome-wide association studies).

Wynik analizy SNP może w przyszłości stać się podstawą tworzenia genetycznych „wizytówek" człowieka (por. http://snp.cshl.org).

Nasza wiedza o organizacji genomu poszerzyła się o polimorfizm zmiennej liczby kopii fragmentów DNA. CNV (ang. copy number variation) obejmuje delecje i duplikacje fragmentów chromosomów. W genomie człowieka zidentyfikowano ponad 1500 regionów CNV i szacuje się, że stanowi to około 12% jego wielkości. Szacuje się też, że częstość występowania większości opisanych CNV w populacji nie przekracza kilku procent. Rozmieszczenie CNV w genomie nie wydaje się całkowicie przypadkowe i jest związane z jego strukturą. CNV, podobnie jak SNP i inne typy polimorfizmów sekwencji nukleotydowych, stanowi o osobniczym charakterze danego genomu (danej osoby), a niekiedy i grupy etnicznej. CNV może być dziedziczony z pokolenia na pokolenie, mieć charakter zmian somatycznych – tkankowo zależnych, może powstawać *de novo*. Polimorfizmowi typu CNV przypisuje się znaczenie w procesie ewolucji genomu w dużo większym stopniu niż np. mutacjom pojedynczych nukleotydów.

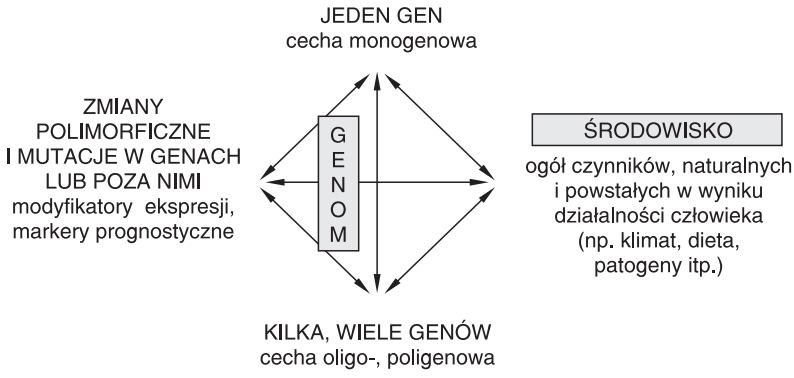
Wykazano, że CNV dotyczy około 15% genów, których mutacje mają znaczenie w patologii molekularnej znanych chorób genetycznie uwarunkowanych. Znanych jest obecnie szereg chorób „wrażliwych" na dawkę genu. Duplikacja genu *LMNB1* jest odpowiedzialna za występowanie autosomalnie dominującej postaci leukodystrofii (ADLD), a przewlekłe zapalenie trzustki może być powodowane mutacją punktową w genie *PRSS1* lub triplikacją tego genu. Rolę CNV wykazano w chorobie Charcota–Mariego–Tootha typu 1A, neurofibromatozie typu 1 czy w podatności na zakażenie wirusem HIV (liczba kopii genu *CCL3L1* warunkuje stopień podatności na zakażenie). Wpływ CNV na obraz kliniczny choroby jest z kolei dobrze widoczny w przebiegu rdzeniowego zaniku mięśni (ang. spinal muscular atrophy, SMA). Choroba warunkowana jest najczęściej homozygotyczną delecją eksonu 7 genu *SMN1*. Modyfikatorem fenotypu SMA jest gen *SMN2*, którego liczba kopii w populacji kształtuje się od zera do sześciu. Im większa liczba genów *SMN2*, tym fenotyp SMA jest łagodniejszy (gen *SMN2* odpowiada za ok. 15% aktywnego białka SMN). Wykazano również, że w populacjach, gdzie tradycyjnie dieta oparta jest (była) w dużym stopniu na spożyciu skrobi, liczba genów *AMY1* kodujących, obecną w ślinie, α-amylazę jest średnio większa, niż w populacjach wykorzystujących inne składniki odżywcze. Występowanie CNV okazało się też charakterystyczne dla fragmentów subtelomerowych wielu chromosomów. W regionach tych mapuje się szereg rearanżacji mających znaczenie kliniczne.

Wydaje się, że często obserwowana asocjacja między występowaniem CNV i SNP a wariantami ekspresji danego genu może być modelowa dla chorób kompleksowych, takich jak schizofrenia, autyzm, choroba Parkinsona czy Alzheimera.

II.3.4. Relacje genotyp–fenotyp

Występowanie chorób dziedzicznych jest spowodowane mutacjami genu (genów). Na obraz kliniczny choroby składają się dodatkowo tok dziedziczenia, typ mutacji odpowiedzialnej za defekt genu, funkcja kodowanego przez gen polipeptydu, wzajemne relacje między białkami oraz wpływ genetycznych i środowiskowych modyfikatorów funkcji genu (*ryc. II-23*).

Przykłady zależności między rodzajem i lokalizacją mutacji w danym genie a obserwowanym fenotypem klinicznym można znaleźć w dystrofii typu Duchenne'a i Beckera. Większość mutacji w genie *DMD* ma charakter delecji. Gdy mutacje



Rycina II-23. Zależność genotyp–fenotyp w ekspresji cech dziedzicznych

Tabela II-9. Przykłady różnych chorób dziedzicznych wywoływanych mutacjami w tym samym genie

Gen	Lokalizacja	Choroba
PAX3	2q35	– zespół Waardenburga – mięśniak mięśni prążkowanych
RET	10q11.2	– rdzeniasty rak tarczycy typu 2A i 2B, – choroba Hirschsprunga – postać rodzinna rdzeniastego raka tarczycy
SCN4A	17q23.1-q25.3	– paramiotonia wrodzona – porażenie napadowe hipokaliemiczne – miotonia wrodzona
PRNP	20p12-pter	– choroba Creutzfeldta–Jakoba – śmiertelna rodzinna bezsenność
GNAS1	20q13.2	– osteodystrofia Albrighta – zespół McCune'a–Albrighta
AR	Xcen-q22	– zespół niewrażliwości na androgeny – choroba Kennedy'ego

te są zlokalizowane na początku genu, obserwuje się występowanie dystrofii mięśniowej o bardzo ciężkim przebiegu (typu Duchenne'a). Delecje obejmujące końcowe odcinki genu *DMD* są odpowiedzialne za postać dystrofii przebiegającej znacznie łagodniej (typu Beckera).

Różnorodność cech fenotypowych obserwowanych w wielu chorobach uwarunkowanych genetycznie może być powodowana również funkcją danego genu zależną od tkanki, w której ulega on ekspresji. Taki mechanizm prawdopodobnie jest przyczyną występowania z jednej strony dziedzicznej choroby Hirschsprunga (defekt unerwienia odcinka jelita grubego), z drugiej zaś wielu zmian nowotworowych. W obu przypadkach pierwotny defekt jest umiejscowiony w tym samym genie *RET* (*tab. II-9*).

Obserwowany obraz kliniczny określonej choroby dziedzicznej może być też funkcją mutacji różnych genów. Często towarzyszy temu szerszy aniżeli w chorobach jednogenowych zakres zmian klinicznych. Mutacje w wielotorbielowatości nerek mapują się w genie *PKD1* umiejscowionym w chromosomie 16 i w genie *PKD2* z chromosomu 4. Mniej więcej połowa przypadków rodzinnej postaci stwardnienia guzowatego jest sprzężona z genem *TSC1* (9q34), a druga połowa z genem *TSC2* umiejscowionym blisko genu *PKD1*. Podobnie zmienność objawów klinicznych w różnych postaciach kardiomiopatii przerostowej znajduje wytłumaczenie w występowaniu charakterystycznych dla tej choroby mutacji w kilku różnych *loci* (*tab. II-10*).

Tabela II-10. Niektóre geny, których mutacje prowadzą do kardiomiopatii przerostowej

Nazwa genu	Kodowany produkt	Lokalizacja genu	Częstość przypadków kardiomiopatii (%)
CMH1	łańcuch ciężki β-miozyny	14q11	30
CMH2	troponina T	1q3	15
CMH3	α-tropomiozyna	15q2	3
CMH4	sercowe białko C	11p11.2	15
CMH7	troponina I	19p13.2-q13.2	< 1

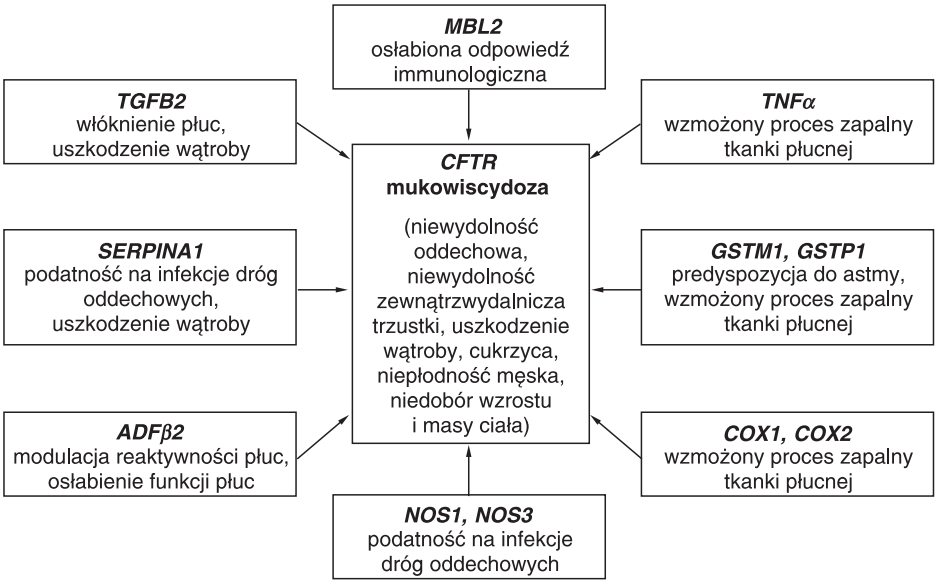
Wg S.L. Chojnowskiej, Klinika Kardiologii Ogólnej Instytutu Kardiologii, Warszawa.

Heterogenność objawów klinicznych sprawia, że nomenklatura molekularna często nie odpowiada nazewnictwu przyjętemu w medycynie. Wykazano na przykład, że defekt genu *CFTR*, charakterystyczny dla mukowiscydozy, stwierdza się także w niezależnie dotychczas klasyfikowanych chorobach, takich jak: obu- i jednostronna niedrożność przewodów nasiennych, przewlekłe zapalenie oskrzeli, rozstrzenie oskrzeli, przewlekłe zapalenie zatok obocznych nosa z polipowatością, kropidlakowe alergiczne odoskrzelowe zapalenie płuc. Infekcje bakteryjne, wiele schorzeń układu oddechowego czy też niedrożność przewodów nasiennych u mężczyzn są klasycznymi objawami mukowiscydozy. Wydaje się więc, że w opisanych przypadkach wielość objawów chorobowych jest przejawem zmienności na poziomie genu, a wymienione schorzenia należałoby klasyfikować raczej jako łagodne postaci mukowiscydozy lub choroby *CFTR*-zależne.

W niektórych chorobach dziedziczonych jako cecha autosomalna recesywna obserwuje się niekiedy pewne odstępstwa od tego kanonu dziedziczenia. Zaobserwowano bowiem występowanie cech klinicznych choroby również u nosicieli zmutowanego genu. U obligatoryjnych nosicieli mutacji w genie *GALT* czy *GALK* stwierdza się czasem występowanie zaćmy. U nosicieli braku α-1-antytrypsyny częściej niż w populacji ogólnej obserwuje się występowanie chorób płuc, a u niektórych nosicieli cystationurii obecność kamieni nerkowych. Być może za obserwowane zjawiska odpowiada zredukowanie u heterozygot ilości wytwarzanego białka. Wiadomo jednak, że np. w mukowiscydozie niespełna 10% prawidłowego mRNA jest zdolne do supresji defektu genu *CFTR*. Jak się wydaje, większość opisanych przypadków jest cechą osobniczą i wynika z nałożenia się zmian w innych genach, tzw. modyfikatorach. Ważną zmienną jest też wpływ środowiska. U nosicieli braku α-1-antytrypsyny występowanie niektórych objawów chorobowych ze strony układu oddechowego jest uzależnione np. od palenia papierosów.

Wpływ genów modyfikatorów często uwidacznia się dużą rozpiętością skali objawów klinicznych. Mukowiscydoza dziedziczy się jako cecha monogenowa, ale oddziaływania oligogenowe modyfikują obserwowany fenotyp choroby (*ryc. II-24*).

Do niedawna w rozważaniach genotyp–fenotyp tylko w niewielkim stopniu uwzględniano rolę, jaką może w nich odgrywać ncRNA. Jak się wydaje, defekty obejmujące tę klasę RNA, w przypadku ekspresji pewnej klasy genów, mogą mieć znaczenie decydujące (por. wyciszanie ekspresji genów).



Rycina II-24. Schemat obrazujący możliwy wpływ drugorzędowych czynników genetycznych położonych poza genem *CFTR*, tzw. modyfikatorów, na obraz kliniczny mukowiscydozy. Współwystępowanie patogennych mutacji genu *CFTR* oraz poszczególnych wariantów molekularnych w obrębie genów modyfikatorów jest jednym z ważniejszych czynników odpowiedzialnych za znaczącą różnorodność przebiegu choroby, także u pacjentów z tym samym genotypem *CFTR*. Heterogenność fenotypowa dotyczy zarówno stopnia nasilenia zmian klinicznych i ich progresji w czasie, jak też różnych postaci choroby związanych z uszkodzeniem poszczególnych narządów i układów. Tekstem pochyłym zaznaczono nazwy genów. (Wg K. Czerskiej, Zakład Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka)

II.3.4.1. Recesywność i dominacja

Wprowadzenie rozróżnienia cech na recesywne i dominujące zawdzięczamy Mendlowi. Gdy allele genu różnią się między sobą i jeden z nich dominuje, to on określa fenotyp. Taki układ alleli jest nazywany heterozygotycznym. Układ, w którym spotykają się dwa identyczne allele, określa się jako homozygotyczny, niezależnie od tego, czy tworzą go dwa allele dominujące (homozygota dominująca), czy dwa allele recesywne (homozygota recesywna, *ryc. II-25*).

Zjawisko recesywności/dominacji zakłada ekspresję dwóch alleli tego samego genu. Jak się obecnie szacuje, około 90% wszystkich znanych mutacji to mutacje odpowiedzialne za powstanie alleli recesywnych. Powstający w takim przypadku produkt zmutowanego genu ma z reguły charakter neutralny, jest nieaktywny, lub też brak go częściowo bądź całkowicie. Konsekwencją odziedziczenia zmutowanych alleli recesywnych danego genu (jednego od ojca, drugiego od matki) jest wystąpienie choroby dziedziczącej się w sposób recesywny. Wyjątkiem jest ujawnianie się alleli recesywnych u osób płci męskiej, gdy gen jest położony w chromosomie X (tzw. hemizygota).

Mutacje dominujące rzadko występują w stanie homozygotycznym. Prawdopodobnie taki genotyp jest najczęściej letalny dla organizmu. Do nielicznych wyjątków należy hipercholesterolemia rodzinna.

Dominująca jest mutacja prowadząca do zwiększenia dawki genu, jak to występuje podczas zmiany liczby kopii z 2 na 3 w zespole Downa czy w innych trisomiach u człowieka. Efekt dominujący może mieć niekiedy także redukcja dawki genu. Przykładem są sytuacje, w których produkt danego genu jest w dużej ilości niezbędny dla organizmu, jak na przykład w syntezie kolagenu, globiny czy receptora LDL. Wystąpienie choroby jest w tym przypadku efektem obniżenia się poziomu białka poniżej pewnej niezbędnej dla organizmu dawki progowej.

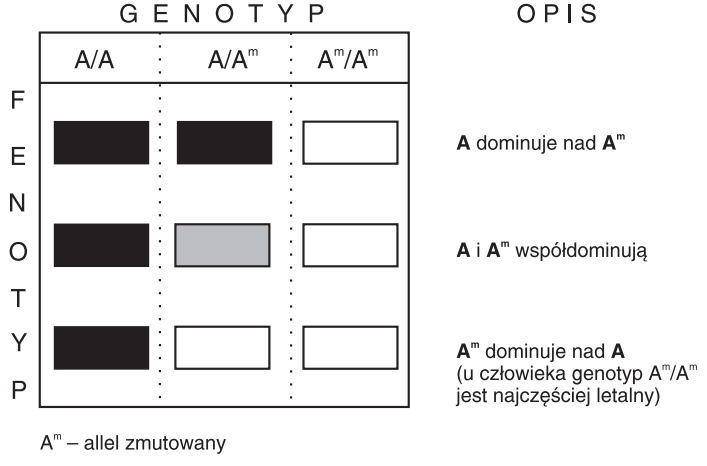
Gdy białko funkcjonuje jako multimer, zmiana nawet jednej podjednostki może prowadzić do zmiany funkcji całego kompleksu. Efekt dominacji obserwuje się także, gdy zmutowane białko jest toksyczne dla organizmu, czy też uzyskuje nową funkcję, jak na przykład w jednej z mutacji w genie kodującym α-1-antytrypsynę. Mutacja ta, przez zmianę miejsca katalitycznego, nadaje białku aktywność antytrombiny. Innym przykładem jest powstanie nowego białka na skutek translokacji chromosomów 9 i 22 i utworzenie genu fuzyjnego *ABL-BCR*.

Obserwowanym niekiedy zjawiskiem jest brak jednoznacznej dominacji jednego z alleli. Efektem tego jest współdziałanie w tworzeniu nowego fenotypu równocześnie obu alleli, czyli kodominacja.

Poznanie mechanizmu dominacji (recesywności) danej cechy na poziomie molekularnym jest ważne dla zrozumienia ekspresji klinicznej choroby, a także z punktu widzenia ewentualnej terapii genowej. Inne sposoby postępowania przewiduje się w leczeniu chorób o dziedziczeniu dominującym, a inne – recesywnym.

II.3.4.2. Antycypacja

Antycypacja lub wyprzedzenie to zjawisko cięższego (ostrzejszego) przebiegu chorób, z wcześniejszymi objawami, w kolejnych pokoleniach. Zjawis-



Rycina II-25. Schemat zależności między dominacją alleli a fenotypem osobnika. (Wg Wilkie A.O.M., *J. Med. Genet*. 91, 89, 1994)

ko to opisano na początku XX wieku, do niedawna jednak nie uważano za związane z podłożem genetycznym chorób, w których je obserwowano, lecz jedynie za wynik zmian środowiskowych lub selekcji sprzyjającej nielosowemu doborowi badanych przypadków. Zjawisko to trudno wytłumaczyć na gruncie klasycznej genetyki mendlowskiej, jednakże dobrze tłumaczy je obserwowana niestabilność sekwencji mikrosatelitarnych, stanowiąca jego podłoże molekularne.

Antycypację opisano w dziedziczeniu większości chorób neurogenetycznych powodowanych mutacjami dynamicznymi. Charakterystyczne jest, że występowanie ostrzejszych postaci schorzeń jest uzależnione od tego, od którego z rodziców mutacja dynamiczna została odziedziczona. W przypadku chorób powodowanych niestabilnymi sekwencjami $(CAG)_n$ w otwartej ramce odczytu, jak np. w chorobie Huntingtona, antycypacja prowadząca do postaci młodzieńczej/dziecięcej występuje wówczas, gdy choroba jest przekazywana przez ojca. Jest to wynikiem dużej niestabilności tych sekwencji w spermatogenezie.

W przypadku chorób powodowanych niestabilnymi sekwencjami położonymi poza otwartą ramką odczytu, np. $(CTG)_n$ w 3' UTR genu w dystrofii miotonicznej, antycypacja prowadząca w formie najostrzejszej do wrodzonej postaci DM występuje w dziedziczeniu mutacji od matki. W przypadku dziedziczenia odojcowskiego w DM i SCA8 stwierdza się natomiast zjawisko kontrakcji – wyraźnego zmniejszenia, w pewnych przypadkach, liczby powtórzeń chorobotwórczych. Jest to najprawdopodobniej wynikiem negatywnej selekcji silnie wydłużonych sekwencji na etapie spermatogenezy.

Zjawisko antycypacji obserwuje się również w chorobach Parkinsona, Alzheimera, zespole Blaua, raku okrężnicy, raku piersi, gośćcu stawowym i wielu innych (*tab. II-11*). Wykluczono, aby za antycypację w schizofrenii była odpowiedzialna ekspansja trójnukleotydowych powtórzeń. Wydaje się jednak prawdopodobne, że antycypacja w tym przypadku może być powodowana niestabilnością innego typu sekwencji nukleotydowej. Przykładem tego typu zmian może być defekt w genie *CSTB* kodującym cystatininę B, odpowiedzialny za występowanie padaczki mioklonicznej (*EPM1*). U chorych z tym zespołem wykazano w nieulegającym translacji rejonie 5' ekspansję 12-nukleotydowej sekwencji CCCCGCCCCGCG.

II.3.5. Priony

Choroby prionowe zalicza się do dużej grupy tzw. chorób konformacyjnych. W skład tej grupy wchodzą również takie choroby, jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntigtona, jak też inne choroby neurodegeneracyjne ujawniające się w późnym okresie życia. Ich wspólną cechą jest zaburzenie w zwijaniu białek, co na terenie komórki przejawia się tendencją do tworzenia agregatów.

Choroby wywoływane przez priony (ang. proteinaceous infectious particles, prion) charakteryzują się zmianami degeneracyjnymi w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Ze względu na widoczne ubytki w tkance mózgowej często są określane jako encefalopatie gąbczaste. Przyczyną chorób jest defekt w glikoproteinie błonowej występującej głównie w tkance nerwowej, tzw. białku prionowym. Choroby wywołane przez priony są równocześnie zakaźne i dziedziczne. Ta dwoista natura oraz to, że w materiale zakaźnym nie znajdowano kwasów nukleinowych mimo sugestii, iż priony mogą być czynnikiem infekcyjnym podobnym do wirusów, długo pozostawały niewyjaśnione.

Dziedziczne postacie chorób prionowych stanowią około 10–15% wszystkich zachorowań tego typu. Wywołane są mutacjami w genie *PRNP*. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad kilka-

Tabela II-11. Przykłady antycypacji w chorobach genetycznie uwarunkowanych

Nazwa choroby	Wiek pojawienia się objawów klinicznych (w latach)			Liczba badanych przypadków
	rodzice	dzieci	różnica wieku	
Dystrofia miotoniczna	38	15	23	51
Choroba Huntingtona	41	32	9	153
Choroby psychiczne (łącznie)	50	34	16	1728
Choroba Charcota–Mariego–Tootha	24	19	5	86
Jaskra dziedziczna	42	30	12	113

C. Stern, *Podstawy genetyki człowieka*, PZWL, Warszawa 1967.

dziesiąt różnych mutacji. Gen *PRNP* jest umiejscowiony w chromosomie 20 i koduje białko o wysoce konserwatywnej strukturze, złożone z około 250 aminokwasów. Funkcja białka nie jest znana. Sugeruje się jego udział w stabilizacji komórek mózgowych oraz w regulacji rytmu snu i czuwania. Nowsze badania wskazują na rolę ochronną osłonek neuronów. Wydaje się, że przejście białka kodowanego w genie *PRNP* w formę prionu wiąże się głównie ze zmianą jego konformacji. Zmiana ta nie musi być koniecznie wynikiem mutacji. Cechą białka prionowego jest przekształcanie, na swoje podobieństwo, białek powstałych w wyniku ekspresji genu *PRNP*. Mamy tu więc do czynienia ze swoistym efektem domina. Wystarczy pojedyncza cząsteczka prionu, aby pozostałe białka PRNP przyjęły z czasem konformację prionu. Nie wiadomo, w jaki sposób priony powodują uszkodzenie mózgu. Obserwuje się jedynie ich formowanie i odkładanie w postaci płytek, podobnie jak w chorobie Alzheimera.

Opisano cztery choroby prionowe człowieka: kuru, chorobę Creutzfeldta–Jakoba (CJD), zespół Gerstmanna–Strausslera–Scheinkera i śmiertelną rodzinną bezsenność. Są to choroby występujące niezwykle rzadko. Kuru stwierdzono jedynie w Nowej Gwinei. Jej „poziome" przekazywanie wśród członków plemienia Fore kojarzone jest z rytualnym kanibalizmem. CJD występuje z częstością 1 na milion. Większą częstość zachorowań stwierdza się jedynie wśród Żydów libijskich. Znany jest natomiast we Francji przypadek nieumyślnego przeniesienia tej choroby na dzieci leczone hormonem wzrostu otrzymanym z przysadek mózgowych osób zmarłych na CJD. Zespół Gerstmana–Staussslera–Scheinkera zidentyfikowano w kilkudziesięciu rodzinach na świecie, a śmiertelną dziedziczną bezsenność w kilku. Wszystkie choroby prionowe dziedziczą się w sposób dominujący. Są nieuleczalne.

Choroby prionowe występują również u zwierząt. Najwcześniej opisaną chorobą (1732 r.) jest scrapie występująca u owiec i kóz. Zakażenia międzygatunkowe są tym łatwiejsze, im większe jest podobieństwo w sekwencji aminokwasów białka prionowego.

Na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku w Wielkiej Brytanii stwierdzono kilkanaście przypadków zachorowań na nowy, nieznany do tej pory, wariant choroby CJD. Uważa się, że jest on ludzką odmianą tzw. choroby wściekłych krów (ang. bovine spongiform encephalopathy, BSE) i został przeniesiony na człowieka w wyniku spożywania mięsa (przetworów mięsnych) krów z BSE. Przypadki BSE wykryto w wielu krajach europejskich. Choroba wściekłych krów jest chorobą prionową. Źródła zachorowań poszukuje się w skarmianiu bydła mączką mięsno-kostną wytwarzaną między innymi z owiec chorych na scrapie. Zaskoczeniem było pokonanie bariery międzygatunkowej przez niewielkie, jak się sądzi, dawki prionów. W Wielkiej Brytanii, w latach 1995–2008, na odzwierzęcą postać CJD zmarło ponad 160 osób. Średni wiek zachorowania wynosił 27 lat. Spośród testowanych wszyscy mieli identyczne zmiany w pozycji 129 genu *PRNP*. Czy przypadki zachorowań będą się pojawiać w kolejnych latach, czy też miały charakter lokalny, trudno obecnie powiedzieć. Badanie i poznanie chorób prionowych oraz ewentualnych czynników (tło genetyczne) sprzyjających ich powstawaniu jest metodycznie trudne i wyników nie można się spodziewać zbyt szybko.

Piśmiennictwo uzupełniające

1. Bereta J., Koj A.: *Zarys biochemii*. Seria Wydawnictwa Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2009.
2. Brown T.A.: *Genomy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.
3. Epstein R.J.: *Biologia molekularna człowieka*. Wydawnictwo Czelej Sp. z o.o., Lublin 2006.
4. *Genetyka molekularna*. Red. nauk. P. Węgleński. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
5. Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A.: *Essential of genetics*. Wydanie 6. Person. Prentice Hall. 2007.
6. Krebs J.E., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T.: *Lewin's Genes X*. Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo 2010.
7. Miller O.J., Therman E.: *Human chromosomes*. Springer Verlag, New York, Inc. 2001.
8. Passarqe E.: *Genetyka. Ilustrowany przewodnik*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 2004.
9. Prusiner S.B.: *Biology and genetics of prions causincy neurodegeneration.* Annu. Rev. Genet. 2013; 47: 601-623.
10. The 1000 genomes project consortium. A global reference for human genetic variation 2015. Nature 526: 68-74.
11. Strachan T., Read A.P.: *Human molecular genetics*. Garland Sciences, Wyd. 4, 2011.
12. Turner P.C., McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.H.: *Krótkie wyklady. Biologia molekularna*. Wyd. 2. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.
13. Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R.: *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin Cummings/Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. Wyd. V.
14. Wilson J., Hunt T.: *Molecular biology of the cell*, Wyd. 5. Garland Science, Taylor and Francis Group. 2005.

ROZDZIAŁ III

Uwarunkowanie genetyczne chorób dziedzicznych

Jerzy Bal, Tadeusz Mazurczak

III.1. Dziedziczenie autosomalne recesywne 44
III.2. Dziedziczenie autosomalne dominujące 45
III.3. Dziedziczenie sprzężone z chromosomem X 46
III.4. Dziedziczenie wieloczynnikowe 46
III.5. Dziedziczenie mitochondrialne 49

O chorobach dziedzicznych mówi się wtedy, gdy choroba spowodowana przez mutację jednego bądź więcej genów lub też aberrację chromosomową jest przekazywana w rodzinie w kolejnym pokoleniu. Swoistym wyjątkiem są mutacje powstające *de novo*, odpowiedzialne za wystąpienie choroby, które nie są przekazywane następnym pokoleniom ze względu na letalność lub uniemożliwienie prokreacji. Zmiany w DNA zostają wniesione wraz z gametami rodziców bądź też (jako mutacje) następują we wczesnych podziałach zygoty.

Przyjmuje się, że częstość występowania w populacji określonej choroby dziedzicznej zależy od częstości występowania mutacji odpowiedzialnej za tę chorobę i statusu jej dziedziczenia (*tab. III-1*). Szacuje się na przykład, że co 23 osoba w Polsce jest nosicielem zmutowanego allela genu *CFTR*, którego mutacje w obu allelach warunkują wystąpienie mukowiscydozy. Natomiast częstość występowania tej choroby w populacji wynosi około 1 na 2500 żywo urodzonych.

Niekiedy ryzyko wystąpienia choroby uwarunkowanej genetycznie jest większe od populacyjnego. W pierwszym rzędzie dotyczy to tzw. rodzin ryzyka genetycznego, to znaczy rodzin, w których poprzednio zanotowano wystąpienie określonej choroby dziedzicznej, a także małżeństw między krewnymi. W przypadku niektórych defektów genetycznych wzrost częstości ich występowania jest zależny od wieku rodziców, głównie matki (np. zespół Downa).

Zwiększonej częstości schorzeń genetycznych należy również oczekiwać w sytuacjach, gdy przyszli rodzice są narażeni na wpływ identycznych lub podobnych czynników mutagennych.

W pewnych populacjach niektóre choroby genetycznie uwarunkowane występują częściej niż w innych (*tab. III-2*). Odrębność takiej populacji może niekiedy wynikać z barier geograficznych lub też być spowodowana izolacją danej społeczności ze względu na odmienność etniczną, kulturową lub religijną.

Problemy wczesnej diagnostyki chorób genetycznych, a także poszukiwanie metod skutecznej ich terapii stanowią jedno z ważniejszych zagadnień współczesnej medycyny. W szczególny sposób dotyczą one pediatrii, ponieważ ogromna większość, bo blisko 90% chorób jednogenowych, ujawnia się klinicznie przed okresem dojrzewania płciowego. To lekarz pediatra jest zazwyczaj tym specjalistą, który pierwszy rozpoznaje lub podejrzewa chorobę genetyczną u dziecka, identyfikując tym samym rodzinę ryzyka.

Mimo że choroby dziedziczące się jednogenowo są chorobami stosunkowo rzadko rozpoznawanymi, dotyczą one jednak około 1% noworodków żywo urodzonych i są odpowiedzialne za około 7% martwych urodzeń i zgonów w okresie okołoporodowym (*tab. III-3*). Stanowią też ponad 70% przyczyn hospitalizacji w szpitalach dziecięcych, przy czym znakomita ich większość to choroby przewlekłe, których leczenie pochłania około 80% środków finansowych szpitala. Stwierdza się

Tabela III-1. Przykłady uwarunkowanych genetycznie chorób jednogenowych

Choroba	Częstość na 1000 urodzeń	Główne objawy kliniczne
Dziedziczenie autosomalne recesywne		
Mukowiscydoza	0,5	przewlekła choroba płuc (infekcje), zaburzenia łaknienia, wyniszczenie
Fenyloketonuria	0,2	niepełnosprawność intelektualna
Brak α-1-antytrypsyny	0,11	upośledzenie funkcji wątroby, rozedma płuc
Galaktozemia	0,02	upośledzenie rozwoju psychoruchowego oraz funkcji wątroby
Choroba Taya–Sachsa	0,004	upośledzenie umysłowe, ślepota
Dziedziczenie autosomalne dominujące		
Hipercholesterolemia rodzinna	2,0	choroba niedokrwienna serca, zawał serca w młodym wieku, wczesny zgon
Wielotorbielowatość nerek	0,8	powiększenie nerek, objawy postępującej niewydolności nerek
Choroba Huntingtona	0,1	ruchy pląsawicze, postępująca degradacja intelektualna
Achondroplazja	0,2	karłowatość nieproporcjonalna, skrócenie kończyn, duża głowa
Dziedziczenie sprzężone z płcią		
Dystrofia Duchenne'a i Beckera	0,14 (chłopcy)	postępujące upośledzenie funkcji ruchowych mięśni, kaczkowaty chód, trudności w podnoszeniu się z pozycji leżącej i w chodzeniu po schodach
Hemofilia A	0,1 (chłopcy)	epizody krwawienia
Zespół FraX	0,5 (chłopcy) 0,3 (dziewczynki)	niepełnosprawność intelektualna, cechy dysmorfii twarzy, makroorchidyzm u mężczyzn po okresie dojrzewania

Tabela III-2. Choroby genetycznie uwarunkowane charakterystyczne dla grupy etnicznej

Grupa etniczna	Nazwa choroby
Afrykańczycy (czarni)	hemoglobinopatie HbSC, α- i β-talasemia, brak dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej
Żydzi aszkenazyjscy	choroba Taya–Sachsa, choroba Gauchera, choroba Niemanna–Picka, zespół Blooma, zespół Canavana, rodzinna dyzautonomia
Chińczycy	α-talasemia, brak dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej
Eskimosi	wrodzony przerost nadnerczy
Finowie	nerczyca wrodzona
Kanadyjczycy pochodzenia francuskiego	tyrozynemia typu I, choroba Taya–Sachsa
Europejczycy (biali)	mukowiscydoza, fenyloketonuria

także, na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci, istotny wzrost udziału chorób dziedziczących się jednogenowo w kształtowaniu wskaźnika zgonów niemowląt. Wynosił on 2% na początku stulecia, a w latach pięćdziesiątych osiągnął 12%. Wzrost ten jest spowodowany przede wszystkim zmniejszeniem odsetka zgonów niemowląt z powodu chorób infekcyjnych oraz lepszą wykrywalnością chorób dziedzicznych, a nie rzeczywistym wzrostem częstości ich występowania.

W katalogu McKusicka (2010) opisano ponad 7 000 chorób dziedziczących się jednogenowo.

Tabela III-3. Częstość występowania chorób genetycznych

Rodzaj uwarunkowania	Liczba chorób	Częstość na 1000 żywych urodzeń
Chromosomowe	> 600	9
Jednogenowe	4458	20
autosomalne dominujące	1730	2
autosomalne recesywne	412	2
sprzężone z X recesywne		
Wieloczynnikowe		
wady rozwojowe	> 50	6
choroby przewlekłe dorosłych	> 50	10
Mitochondrialne	59	rzadkie
Mutacje komórek somatycznych*	>100	250
Ogółem		386

Wg J.M. Connora, M.A. Ferguson-Smitha *Podstawy genetyki medycznej*. PZWL, Warszawa 1991, 1998 oraz uzupełnienia.

Ten najpełniejszy zbiór jest również dostępny poprzez światową sieć komputerową (https://www.omim.org).

Diagnostyka biochemiczna chorób genetycznie uwarunkowanych obejmowała do niedawna tylko tę część chorób dziedziczących się jednogenowo, w których jest znany produkt genu. W praktyce dotyczyła diagnostyki, w tym także prenatalnej, ponad 100 wrodzonych błędów metabolicznych. Nie miała więc zastosowania w większości chorób, w których diagnostyka jest oparta wyłącznie na obrazie klinicznym, a prawdopodobieństwo nosicielstwa genu określa się przez analizę rodowodu, znajomość dziedziczenia choroby oraz częstość jej występowania w populacji. W przypadku badań prenatalnych diagnostyka biochemiczna ograniczała się do możliwości stwierdzenia bloku metabolicznego w hodowli amniocytów lub analizy poziomu białek, które przeniknęły do płynu owodniowego.

Obserwowany od połowy lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku szybki rozwój biologii molekularnej przyczynił się w istotnym stopniu do lepszego zrozumienia patomechanizmu wielu chorób uwarunkowanych genetycznie. Metody analizy DNA znajdują praktyczne zastosowanie w diagnostyce klinicznej licznych chorób genetycznych, a możliwości ich wykorzystywania są jednym z głównych elementów określających poziom nowoczesności diagnostycznej ośrodków klinicznych.

Zastosowanie metod cytogenetycznych i molekularnych w diagnostyce klinicznej umożliwia, pośrednio lub bezpośrednio, wykazanie obecności nieprawidłowego genu u chorego i członków jego rodziny. Bardzo często istnieje również możliwość identyfikacji mutacji odpowiedzialnych za defekt genu. Lista chorób, które można już obecnie rozpoznawać, wykorzystując techniki analizy DNA, obejmuje ponad 3000 jednostek chorobowych (http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php). Wśród nich można wymienić takie, jak: niedobór α-1-antytrypsyny, jeden z typów zespołu Ehlersa–Danlosa, dystrofię mięśniową typu Duchenne'a i Beckera, niedobór dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej, hemofilie A i B, chorobę Huntingtona, fenyloketonurię, niedokrwistość sierpowatokrwinkową, talasemię, mukowiscydozę, rdzeniowy zanik mięśni, dziedziczne postaci głuchoty.

Zakres zastosowań metod analizy DNA obejmuje te obszary zainteresowań klinicysty, w których współczesne metody diagnostyczne oparte na klasycznych technikach, takich jak analiza enzymatyczna lub immunologiczna produktu genu, nie rozwiązują wszystkich problemów związanych z procesem diagnostycznym. Stała się też możliwa identyfikacja bezobjawowych klinicznie nosicieli zmutowanego genu. Omawiany typ diagnostyki obejmuje swoim zakresem także takie schorzenia, jak choroba Huntingtona, której objawy ujawniają się dopiero u osób dorosłych. Analiza DNA dla wielu chorób genetycznie uwarunkowanych stała się już obecnie postępowaniem diagnostycznym z wyboru.

W najbliższych latach diagnostyka molekularna będzie się koncentrować na określaniu predys-